

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

SANDRINE ESTER DA CRUZ MONTEIRO DE PINA

OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE GENES *pspA* ENTRE
AMOSTRAS DE *Streptococcus pneumoniae* PERTENCENTES A
COMPLEXOS CLONAIIS CIRCULANTES NO BRASIL

RIO DE JANEIRO

2015



Sandrine Ester da Cruz Monteiro de Pina

OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE GENES *pspA* ENTRE
AMOSTRAS DE *Streptococcus pneumoniae* PERTENCENTES A
COMPLEXOS CLONAIIS CIRCULANTES NO BRASIL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientação: Lucia Martins Teixeira

Tatiana Castro Abreu Pinto

Rio de Janeiro

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Dissertação de mestrado

De Pina, Sandrine Ester da Cruz Monteiro

Ocorrência e diversidade de genes *pspA* entre amostras de *Streptococcus pneumoniae* pertencentes a complexos clonais circulantes no Brasil/Sandrine Ester da Cruz Monteiro de Pina – Rio de Janeiro:UFRJ, 2015.

xiii, 88 f.: 17 il; 29,8 cm

Orientadores: Lucia Martins Teixeira e Tatiana de Castro Abreu Pinto

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas [Microbiologia]) -

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, 2015.

Referências bibliográficas: f 47-57.

1. *Streptococcus pneumoniae* 2. Genes *pspA* 3. Complexos clonais 4. proteína de superfície pneumocócica A 5. *Clades* e famílias *pspA* 6. Vacina pneumocócica - Teses. I. Teixeira, Lucia Martins e Pinto, Tatiana de Castro Abreu. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Pós-graduação em Ciências (Microbiologia). III. Ocorrência e diversidade de genes *pspA* entre amostras de *Streptococcus pneumoniae* pertencentes a complexos clonais circulantes no Brasil

FOLHA DE APROVAÇÃO

Sandrine Ester da Cruz Monteiro de Pina

OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE GENES *pspA* ENTRE AMOSTRAS DE *Streptococcus pneumoniae* PERTENCENTES A COMPLEXOS CLONAIIS CIRCULANTES NO BRASIL

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Aprovado em 5 de Agosto de 2015

(Prof^ª. Lúcia Martins Teixeira, Dra. em Ciências (Microbiologia), UFRJ; Orientador)

(Prof^ª. Katia Regina Netto dos Santos, Dra. em Ciências (Microbiologia), UFRJ; Presidente da banca)

(Prof^ª. Lucy Seldin, Dra. em Ciências (Microbiologia), UFRJ; Examinador).

(Prof^ª. Raquel Regina Bonelli, Dra. em Farmácia (Microbiologia Farmacêutica), UFRJ; Examinador).

(Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza, Dr. em Ciências (Microbiologia), UFRJ; Revisor)

Dedico esse trabalho a minha mãe Cesária da Cruz e ao meu pai Luís de Pina, por todo amor, carinho e apoio em todas as fases da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pelo amor incondicional, confiança, incentivo, apoio e principalmente pela força nas horas difíceis.

Ao meu irmão, Luís Filipe, pelos puxões de orelha e incentivo aos estudos.

Toda minha família, tios, tias e primos pelo carinho, especialmente as minhas tias Maria José, Maria Emília e Ângela Fonseca.

À minha orientadora Lucia Martins Teixeira pela confiança, pela oportunidade de desenvolver um projeto e por todo o conhecimento adquirido através do laboratório.

À minha orientadora Tatiana pela amizade, carinho, paciência, ajuda e pelos ensinamentos que contribuíram para a minha formação como microbiologista, foram muito importantes.

Aos meus queridos amigos Bea, Guilherme e Jessyka, pelos momentos de descontração e risos pós laboratório e pelos conselhos.

Às minhas queridas e lindas amigas pneumocócicas, as “pneumas” Aline, Natália, Laura e Luciana, pela amizade e momentos de riso por causa do sotaque “chic”, pelas gargalhadas em momentos de stress e pela imensa ajuda no meu desenvolvimento como microbiologista, através da troca de conhecimentos.

A minha amiga piriquita, Andreia Freitas e ao meu primo brasileiro Felipe Cruz pelo carinho, amizade e conselhos.

Aos meus queridos amigos do Laboratório 027, Adriana, Stephanie, Carol Gomes, Filó, Carol Botelho, Clarissa, Sabrina, Jaque e Rachel, pelos momentos divertidos, pela amizade, pela companhia e pela ajuda em momentos de dúvidas.

Às minhas “irmãs” Eryka Brazão, Karen Pacheco, Karine Silva e Patrícia Rosa pela ajuda nos momentos mais difíceis, pelos conselhos, pela compreensão, pela força, pelos risos em momentos tristes em todos esses anos de amizade, mesmo cada uma estando em continentes diferentes.

Às minhas brasileiras preferidas Daniela Betzler, Iuth Homem, Morgana Sobrinho e Talita Bernardo pela ajuda, e por todos os momentos felizes que passamos juntas, fazendo desses seis anos perfeitos.

Aos meus amigos babinos, ZÁ, Herman Pimenta, Benji Sundblad, Luke Norris, Charlie Wates, Ben Solar-Lowter, Dudu, Keilah, Adeline Mateus, Ludivine, Grace lillie Robinson, Carla Évora e Caito pela amizade, carinho e por terem feito desses dois anos de Mestrado perfeitos.

Aos professores Vânia Lúcia Merquior e Felipe Piedade Neves pelas contribuições teóricas e práticas.

Ao professor José Mauro Peralta e a todos os alunos e funcionários do Laboratório 046 por todo auxílio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), pela oportunidade e contribuição nessa fase da minha vida acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro para a execução do projeto.

RESUMO

De PINA, Sandrine Ester da Cruz Monteiro. Ocorrência e diversidade de genes *pspA* entre amostras de *Streptococcus pneumoniae* pertencentes a complexos clonais circulantes no Brasil. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Streptococcus pneumoniae é um importante patógeno associado a infecções invasivas, sendo também geralmente encontrado na nasofaringe de portadores assintomáticos. A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência e constitui a base das vacinas atualmente licenciadas. Devido às limitações inerentes às vacinas existentes, proteínas desse microrganismo, como a proteína de superfície pneumocócica A (PspA), são consideradas alvos de grande interesse para a formulação de novas estratégias de prevenção. No entanto, devido à natureza polimórfica dos genes *pspA*, torna-se essencial o levantamento de dados sobre a distribuição desses genes entre as amostras de pneumococos circulantes em diferentes regiões geográficas. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo analisar a ocorrência e a diversidade de genes *pspA* entre 413 amostras de *S. pneumoniae* isoladas no Brasil entre 1988 e 2014, além de avaliar a ocorrência desses genes em amostras clínicas de espécies relacionadas (*Streptococcus mitis* e *Streptococcus pseudopneumoniae*), investigar a ocorrência de eventos de recombinação nesses genes e avaliar a distribuição de biomarcadores por MALDI-TOF MS em cada tipo de gene *pspA*. Todas as amostras de *S. pneumoniae* e apenas uma amostra de *S. mitis* albergavam genes *pspA*. Genes da família 2 (com destaque para a *clade* 3) foram os mais comuns (59,6%) com índices de ocorrência crescentes ao longo do tempo, seguidos dos genes da família 1 (39%; com destaque para a *clade* 1) e da família 3 (1,4%; todas *clade* 6). Dentro de uma mesma *clade*, as amostras compartilharam >80% de similaridade em fragmentos do gene *pspA*, sendo as *clades* pertencentes a uma mesma família mais próximas entre si evolutivamente. Os tipos de genes *pspA* foram conservados dentro de cada complexo clonal, independente de qualquer outra característica da amostra (como sorotipo, origem clínica e perfil de susceptibilidade à penicilina). Sinais de eventos de recombinação foram detectados, entre amostras de *S. pneumoniae* e *S. mitis*, em fragmentos do gene *pspA* que representam os alvos mais prováveis para inclusão em uma nova vacina baseada em PspA. MALDI-TOF MS apresentou potencial para ser utilizada como alternativa na caracterização dos diferentes tipos de genes *pspA*, distribuindo as amostras de *S. pneumoniae* em subgrupos que se correlacionaram com a família de genes *pspA*, e permitindo a determinação de perfis de biomarcadores de interesse representativos de cada *clade*. Este estudo adiciona dados ao conhecimento da distribuição das famílias e *clades* de genes *pspA* entre as amostras de pneumococos circulantes em nosso meio, sendo este aspecto de extrema importância para a elucidação da epidemiologia desta espécie bacteriana, assim como representa um passo essencial no desenvolvimento de novas estratégias vacinais.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*; genes *pspA*; complexos clonais; proteína de superfície pneumocócica A; *clades* e famílias *pspA*; vacina pneumocócica

ABSTRACT

De PINA, Sandrine Ester da Cruz Monteiro. Ocorrência e diversidade de genes *pspA* entre amostras de *Streptococcus pneumoniae* pertencentes a complexos clonais circulantes no Brasil. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Streptococcus pneumoniae is a major cause of invasive diseases, and it is also usually found in the nasopharynx of asymptomatic carriers. The polysaccharide capsule is the main virulence factor and constitutes the basis for currently licensed vaccines. Due to limitations of the existing vaccines, proteins of this microorganism, such as the pneumococcal surface protein A (PspA), have been considered as interesting targets for the development of novel prophylactic approaches. However, due to the polymorphic nature of *pspA* genes, surveillance on the distribution of such genes among pneumococcal strains circulating in different geographical regions is essential. Therefore, the present study aimed to analyze the occurrence and diversity of *pspA* genes among 413 *S. pneumoniae* strains isolated in Brazil between 1988 and 2014, as well as to evaluate the occurrence of such genes among clinical isolates belonging to closely related species (*Streptococcus mitis* and *Streptococcus pseudopneumoniae*), to investigate the occurrence of recombination events in such genes, and to evaluate the distribution of MALDI-TOF MS biomarkers in each type of *pspA* gene. All *S. pneumoniae* and only one *S. mitis* isolate harbored *pspA* genes. Genes of family 2 (especially clade 3) were the most common (59.6%) presenting a trend to increase over time, followed by genes of family 1 (39%; highlighting clade 1) and family 3 (1.4%; all clade 6). Isolates within each clade shared >80% of similarity in *pspA* gene fragments, and clades belonging to the same family were evolutionarily closer to each other. *pspA* types were conserved within each clonal complex, regardless of any other characteristic of the strain (such as serotype, clinical origin and penicillin susceptibility profile). Signs of recombination events were detected, among *S. pneumoniae* and *S. mitis* isolates, in *pspA* fragments that represent the most likely targets to be included in a novel PspA-based vaccine. MALDI-TOF MS showed potential as an alternative tool for characterizing the different *pspA* types, clustering *S. pneumoniae* strains according to *pspA* family and allowing the determination of profiles containing biomarkers representing each clade. The present study adds important data to the understanding on the distribution of *pspA* families and clades among pneumococcal strains circulating in our setting, being this subject of great importance for elucidating pneumococcal epidemiology and for assisting on the development of new prophylactic approaches.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; *pspA* genes; clonal complexes; pneumococcal surface protein A; *pspA* clades and families; pneumococcal vaccine

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Características das amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> utilizadas como controle para a determinação das famílias e <i>clades</i> de genes <i>pspA</i>	16
Tabela 2-Iniciadores utilizados na amplificação dos genes <i>pspA</i> de <i>Streptococcus pneumoniae</i> no presente estudo	18
Tabela 3-Identidade nucleotídica média entre as sequências da região definidora de <i>clade</i> (CDR) dos genes <i>pspA</i> entre as amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> representantes das diferentes <i>clades</i> e a amostra de <i>Streptococcus mitis</i> incluídas no presente estudo	24
Tabela 4-Perfil de presença (X) ou ausência (0) de biomarcadores detectados pela técnica de MALDI-TOF MS utilizados para a diferenciação das seis <i>clades</i> de genes <i>pspA</i> no presente estudo	35
Tabela 5-Proteínas preditivas representantes dos biomarcadores utilizados para a diferenciação das seis <i>clades</i> de <i>pspA</i> identificadas através da pesquisa do banco de dados de proteínas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> disponível em http://biocyc.org/ (<i>BioCyc Database Collection</i>).....	37

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-Representação esquemática das subunidades que constituem a proteína PspA e posições de nucleotídeos no seu respectivo gene	20
Figura 2-Árvore filogenética baseada no algoritmo <i>Neighbor Joining</i> , construída a partir das sequências nucleotídicas das regiões definidoras de <i>clade</i> (CDR) de amostras representativas de cada <i>clade</i> incluídas no presente estudo	25
Figura 3-Distribuição das famílias de genes <i>pspA</i> de acordo com os principais sorotipos/sorogrupos observados entre as amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> incluídas no presente estudo	26
Figura 4-Distribuição das famílias de genes <i>pspA</i> de acordo com a origem clínica das amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> incluídas no presente estudo	27
Figura 5-Distribuição das famílias de genes <i>pspA</i> de acordo com o perfil de susceptibilidade à penicilina das amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> incluídas no presente estudo	27
Figura 6-Diagrama <i>Minimum Spanning Tree</i> (MST) demonstrando os complexos clonais (CCs) contruídos a partir dos perfis alélicos obtidos por MLST de 390 amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> incluídas no presente estudo	28
Figura 7-Diagrama <i>Minimum Spanning Tree</i> (MST) demonstrando os complexos clonais (CCs) contruídos a partir dos perfis alélicos obtidos por MLVA de 172 amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> incluídas no presente estudo	29
Figura 8-Distribuição das famílias de genes <i>pspA</i> no intervalo de tempo (em anos) abordado no presente estudo	30
Figura 9-Representação dos 13 diferentes eventos de recombinação detectados pelo software RDP4 em fragmentos dos genes <i>pspA</i> de 31 amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> incluídas no presente estudo	32
Figura 10-Diagrama gerado pelo método de correlação de Pearson e o algoritmo de <i>Neighbor Joining</i> demonstrando o agrupamento de 272 amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> de acordo com os seus respectivos espectros gerados pela metodologia de MALDI-TOF MS	33
Figura 11-Espectros representativos das seis diferentes <i>clades</i> de <i>pspA</i> gerados pela metodologia de MALDI-TOF MS no presente estudo	34
Figura 12-Trecho entre as posições 6600 e 7100 <i>m/z</i> dos espectros obtidos por MALDI-TOF MS de amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> pertencentes à <i>clade</i> 6 (cor lilás) e às <i>clades</i> 1, <i>clade</i> 2, <i>clade</i> 3, <i>clade</i> 4 e <i>clade</i> 5 (demais cores na figura), demonstrando a presença ou ausência de um dos biomarcadores propostos pelo presente estudo (6869.43 <i>m/z</i>)	36

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CC, complexo clonal

CDR, do inglês *clade defining region*

Da, daltons

DNA, Ácido desoxirribonucléico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

DPI, doença pneumocócica invasiva

ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immuno Sorbant Assay*

HCCA, ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

kDa, kiloDaltons

LPS, lipopolissacarídeo

LytA, autolisina

MALDI-TOF MS, do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time Of Flight Mass Spectrometry*

MLST, do inglês *Multilocus Sequence Typing*

MLVA, do inglês *Multiple-loci VNTR (Variable-Number of Tandem Repeat) Analysis*

MST, do inglês *Minimum Spanning Tree*

NT, não-tipáveis

pb, pares de bases nucleotídicas

PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PFGE, do inglês *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*

Ply, pneumolisina

PMEN, do inglês *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network*

PNSP, do inglês *Penicillin non-susceptible S. pneumoniae*

PsaA, antígeno de superfície pneumocócica A, do inglês *pneumococcal surface antigen A*

PspA, proteína de superfície pneumocócica A, do inglês *pneumococcal surface protein A*

ST, do inglês *Sequence Type*

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
INTRODUÇÃO.....	1
1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
2 Fatores de virulência.....	3
3 Epidemiologia das infecções pneumocócicas	6
4 Caracterização molecular	8
5 Tratamento e prevenção das infecções pneumocócicas	10
OBJETIVOS	15
MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
1 Amostras bacterianas	16
Tabela 1	16
2 Extração de DNA bacteriano	17
3 Determinação das famílias de genes <i>pspA</i>	17
Tabela 2	18
4 Determinação das <i>clades</i> de genes <i>pspA</i>	19
5 Detecção dos eventos de recombinação nos genes <i>pspA</i>	19
Figura 1	20
6 Caracterização por MALDI-TOF MS	21
7 Análises <i>in silico</i>	21
8 Análises estatísticas	22
RESULTADOS	23
Tabela 3	24

Figura 2.....	25
Figura 3.....	26
Figura 4.....	27
Figura 5.....	27
Figura 6.....	28
Figura 7.....	29
Figura 8.....	30
Figura 9.....	32
Figura 10.....	33
Figura 11.....	34
Tabela 4.....	35
Figura 12.....	36
Tabela 5	37
DISCUSSÃO	38
CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO	58

INTRODUÇÃO

1 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae, também conhecido como pneumococo, é uma bactéria gram-positiva em forma de cocos, que se apresenta aos pares ou em cadeias curtas. Além disso, é anaeróbio facultativo, capnofílico, não produz catalase e é nutricionalmente exigente. Em agar sangue, as colônias exibem α -hemólise, conferindo uma coloração esverdeada ao meio (LUND & HENRICHSEN, 1978). Os pneumococos apresentam uma cápsula de natureza polissacarídica que, além de constituir seu principal fator de virulência, devido à sua variedade antigênica e estrutural, permite a divisão desses microrganismos em 98 sorotipos distintos (HANAGE *et al.*, 2005; JAUNEIKAITE *et al.*, 2015). Para a determinação desses sorotipos, a técnica padrão-ouro é a reação de Quellung, descrita em 1902 por Neufeld (*apud* AUSTRIAN, 1981), na qual a presença do antígeno capsular é detectada por reações com antissoros tipo-específicos (HENRICHSEN, 1995).

S. pneumoniae é reconhecido como patógeno clássico, estando entre as principais causas de morbidade e mortalidade em seres humanos (HENRIQUES-NORMARK & TUOMANEN, 2013). Por outro lado, os pneumococos podem fazer parte da microbiota anfibiótica do trato respiratório superior, colonizando a superfície da mucosa da nasofaringe (MESSMER *et al.*, 2004, CHARALAMBOUS & LEUNG, 2012). A colonização assintomática da nasofaringe é prevalente em crianças e geralmente precede o desenvolvimento de doença pneumocócica invasiva (LAVAL *et al.*, 2006; VERHAGEN *et al.*, 2013).

A identificação e confirmação laboratorial de *S. pneumoniae* é realizada através do isolamento primário de colônias α -hemolíticas em meio de agar sangue de carneiro, que deverá ser seguido por testes fenotípicos, genotípicos e/ou sorológicos, que têm como base características desse microrganismo (CHERIAN *et al.*, 1998; TOIKKA *et al.*, 1999; MORRISON *et al.*, 2000; SPELLERBERG & BRANDT, 2011; SATZKE *et al.*, 2014). Os testes fenotípicos mais utilizados são os testes de susceptibilidade a optoquina e o teste de bile solubilidade (SPELLERBERG & BRANDT, 2011; SATZKE, *et al.*, 2014).

Dentre as características fisiológicas dos pneumococos destaca-se a sua solubilidade na presença de sais biliares. Os sais biliares, especialmente o desoxicolato

de sódio, têm a capacidade de lisar amostras de *S. pneumoniae* através da ativação de enzimas autolíticas (autolisinas) produzidas pela bactéria, que degradam o peptidoglicano, iniciando assim precocemente o processo de autólise observado em culturas de *S. pneumoniae* (MOSSER & TOMASZ, 1970). Embora bastante utilizado na identificação presuntiva, o teste de bile solubilidade tem apresentado resultados divergentes em algumas amostras, sendo relatada na literatura a ocorrência de amostras de *S. pneumoniae* bile insolúveis (OBREGON *et al.*, 2002).

O teste de susceptibilidade à optoquina apresenta um papel fundamental na triagem e identificação de *S. pneumoniae*. Em alguns laboratórios de microbiologia clínica este teste é muitas vezes o único disponível para a diferenciação entre *S. pneumoniae* e outros estreptococos α -hemolíticos, visto que *S. pneumoniae* é considerado universalmente susceptível a optoquina. No entanto, nas duas últimas décadas, tem sido relatada a ocorrência esporádica de cepas resistentes a optoquina, levantando questões sobre a eficácia do esquema de identificação utilizado para esta espécie e, conseqüentemente, a possibilidade de erros no tratamento de pacientes (COGNÉ *et al.*, 2000; PIKIS *et al.*, 2001). Estudos demonstram que essas cepas atípicas geralmente apresentam alta diversidade fenotípica e genética, sendo pertencentes a diversos sorotipos e complexos clonais, incluindo aqueles também observados entre as cepas típicas de pneumococos (PIKIS *et al.*, 2001; DIAS *et al.*, 2007a; PINTO *et al.*, 2013).

Os testes genotípicos são fundamentados em metodologias baseadas em PCR para identificação de sequências específicas de genes que codificam para fatores de virulência específicos do pneumococo, tais como a autolisina (LytA), a pneumolisina (Ply) e o antígeno de superfície pneumocócica A (PsaA), que representam importantes marcadores da espécie (MORRISON *et al.*, 2000; CORLESS *et al.*, 2001; McAVIN *et al.*, 2001).

A correta execução e interpretação dos testes de identificação são essenciais para a diferenciação acurada de *S. pneumoniae* dos outros estreptococos do grupo mitis, dentre os quais se incluem *Streptococcus mitis* e *Streptococcus pseudopneumoniae*, que geralmente colonizam os mesmos sítios anatômicos. As espécies integrantes deste grupo bacteriano são intimamente relacionadas, podendo compartilhar um percentual elevado de genes, incluindo genes envolvidos na virulência. Apesar da semelhança genética, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* apresentam teoricamente um potencial patogênico menor em relação a *S. pneumoniae* (HANAGE *et al.*, 2009; ENGEN *et al.*, 2014). Além disso,

estudos têm demonstrado reação cruzada em respostas de células T de memória entre *S. mitis* e *S. pneumoniae* (WRIGHT *et al.*, 2013; ENGEN *et al.*, 2014).

2 Fatores de virulência

A patogenicidade de *S. pneumoniae* é atribuída a diversos fatores de virulência, alguns constituídos por moléculas associadas à superfície bacteriana e outros por proteínas citoplasmáticas que podem ser liberadas para o meio extracelular. Embora ainda se saiba pouco em relação à expressão dos fatores de virulência durante a infecção, proteínas importantes envolvidas na virulência já foram identificadas e caracterizadas (GARCÍA *et al.*, 1988; KADIOGLU *et al.*, 2008).

A cápsula polissacarídica tem sido reconhecida como o mais importante fator de virulência desde o pioneiro trabalho de Griffith, onde ficou evidenciado que cepas variantes não encapsuladas eram efetivamente não patogênicas (*apud* GARCÍA *et al.*, 2000). Contudo, já foi evidenciada a associação entre amostras de pneumococos não encapsulados com infecções superficiais, tais como conjuntivites (CRUM *et al.*, 2004; VALENTINO *et al.*, 2014). Os polissacarídeos que compõem a cápsula do *S. pneumoniae* são componentes importantes para a virulência, já que promovem a proteção da bactéria contra a fagocitose por células de defesa do sistema imune (BOGAERT *et al.*, 2004; HANAGE *et al.*, 2005; WEISER *et al.*, 2010). Os genes responsáveis pela biossíntese dos polissacarídeos capsulares encontram-se em um único *locus*, o operon *cps*, que apresenta um conjunto de genes específico para cada sorotipo (GARCÍA *et al.*, 2000; KADIOGLU *et al.*, 2008).

Um segundo grupo de fatores de virulência inclui proteínas e enzimas que atuam direta ou indiretamente na patogênese das infecções pneumocócicas, e apresentam-se como bons marcadores da espécie, sendo encontrados em praticamente todas as amostras de pneumococos. Entre eles podemos destacar a pneumolisina (Ply), a autolisina (LytA), o antígeno de superfície pneumocócica A (PsaA) e a proteína de superfície pneumocócica A (PspA) (BOULNOIS, 1992; HOLLINGSHEAD & BRILES, 2001; JEDRZEJAS, 2001; MITCHELL & MITCHELL, 2010).

A Ply é uma proteína de aproximadamente 53 kDa (HIRST *et al.*, 2004; MITCHELL & DALZIEL, 2014). Diferentemente dos demais antígenos pneumocócicos ela é uma enzima citoplasmática, codificada pelo gene constitutivo *ply*, que é liberada após a ação da autolisina. Desta forma, as propriedades de virulência da pneumolisina estão diretamente relacionadas à ação da autolisina (JEDRZEJAS, 2001; MITCHELL &

MITCHELL, 2010). A Ply tem funções distintas, especialmente na fase inicial da patogênese da infecção pneumocócica. Essa proteína se oligomeriza nas membranas das células alvo, para formar um poro transmembrânico (KADIOGLU *et al.*, 2008; MITCHELL & DALZIEL, 2014). Os efeitos citotóxicos da pneumolisina podem inibir a função das células fagocíticas das células do sistema imunes, o que leva a supressão da resposta imune inflamatória do hospedeiro (JEDRZEJAS, 2001; MITCHELL & DALZIEL, 2014). Além disso, a Ply inibe o movimento ciliar das células do epitélio respiratório, impede a ação dos fagócitos inibindo a sua captura pelos mesmos, e também pode induzir a síntese de citocinas, além da ativação de células T CD4⁺ (KADIOGLU *et al.*, 2008; MITCHELL & DALZIEL, 2014).

Uma característica do pneumococco é a sua tendência em sofrer autólise após alcançar a fase estacionária do crescimento celular ou em consequência do uso de antimicrobianos. A enzima responsável por esse processo é a autolisina (LytA-N-acetilmuramyl-l-alanina amidase), codificada pelo gene *lytA*, que age na degradação da peptideoglicana, provocando uma desestabilização da parede bacteriana que resulta em lise celular (JEDRZEJAS, 2001; MITCHELL & MITCHELL, 2010; MELLROTH *et al.*, 2012; MELLROTH *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015). Esta enzima está direta e indiretamente ligada à patogênese da infecção pneumocócica. A LytA apresenta um peso molecular de aproximadamente 36 kDa e é constituída por dois domínios distintos. Um domínio localizado na porção C-terminal que é responsável pela ligação a resíduos de ácidos teicoicos ou lipoteicoicos presentes na superfície celular do microrganismo, sendo essa ligação essencial para a atividade lítica da enzima (LI *et al.*, 2015). O segundo domínio está localizado na porção N-terminal, e é, provavelmente, o responsável direto pela atividade lítica contra a peptideoglicana pneumocócica (GARCÍA *et al.*, 1988; JEDRZEJAS, 2001; MELLROTH *et al.*, 2014). A implicação indireta da ação dessa enzima é a liberação de proteínas citoplasmáticas do pneumococo, incluindo a Ply (TUOMANEN, 1999; MELLROTH *et al.*, 2014). Além disso, LytA é a enzima responsável pela solubilização do *S. pneumoniae* em uma solução contendo 1% de desoxicolato de sódio, constituindo assim um dos principais testes laboratoriais para identificação do pneumococo (LLULL, LÓPEZ & GARCIA, 2006).

A PsaA é um componente do complexo transportador ABC, que é responsável pelo transporte de manganês e zinco para o interior da célula de *S. pneumoniae* (JEDRZEJAS, 2001; RAJAM *et al.*, 2008; MITCHELL & MITCHELL, 2010). O

manganês é essencial para o crescimento do pneumococo e, ao mesmo tempo, funciona como cofator ou regulador da expressão de outros genes, como por exemplo de adesinas (PATON, 1998). Alguns estudos têm relatado que mutações em *psaA* acarretam em deficiência do crescimento bacteriano, da virulência, da capacidade de adesão, além de alterar a resposta ao estresse oxidativo (MARRA *et al.*, 2002; TSENG *et al.*, 2002; RAJAM *et al.*, 2008; MITCHELL & MITCHELL, 2010).

A PspA é um importante fator de virulência expresso por quase todas as amostras de pneumococos (JEDRZEJAS, 2007) e que apresenta peso molecular variado, geralmente entre 67 a 99 kDa. Essa proteína está envolvida na evasão do sistema imune pelo microrganismo, interferindo na fixação dos componentes C1q e C3 do complemento na superfície da bactéria, bloqueando os eventos que levam a opsonização e a fagocitose (BRILES *et al.*, 2003; PAYNE *et al.*, 2005; KADIOGLU *et al.*, 2008; HAKENBECK *et al.*, 2009). O escape do sistema complemento é importante para garantir a sobrevivência bacteriana na corrente sanguínea do hospedeiro humano, como ocorre nos casos de bacteremia e frequentemente nos quadros de meningite pneumocócica (MOOK-KANAMORI *et al.*, 2011). Além disso, a PspA é capaz de se ligar à lactoferrina humana, inibindo o efeito bactericida da apolactoferrina presente nas mucosas (HOLLINGSHEAD, BECKER & BRILES, 2000; HAKENBECK *et al.*, 2009; ROLO *et al.*, 2009).

A PspA é constituída por 5 domínios distintos: (i) um peptídio sinal, (ii) um domínio α -hélice de aproximadamente 288 aminoácidos, (iii) um domínio rico em prolina com aproximadamente 81 aminoácidos, (iv) um domínio de ligação à colina com aproximadamente 20 aminoácidos, que ancora a proteína na superfície celular e (v) uma curta cauda C-terminal contendo aproximadamente 17 aminoácidos (SWIATLO *et al.*, 1997; HOLLINGSHEAD, BECKER & BRILES, 2000; JEDRZEJAS, LAMANI & BECKER, 2001; OCHS *et al.*, 2008; HAKENBECK *et al.*, 2009) (Figura 1). A porção C-terminal é composta por 10 repetições de 20 aminoácidos conservados, que formam um domínio de ligação à colina, o qual é responsável por manter a proteína presa à superfície do pneumococo através da ligação com resíduos de colina do ácido teicoico presente na parede celular bacteriana (JEDRZEJAS, LAMANI & BECKER, 2001; HAKENBECK *et al.*, 2009). O domínio α -hélice, por sua vez, é exposto ao meio extracelular e inclui uma região extremamente polimórfica de aproximadamente 100 aminoácidos denominada região definidora de *clade* (CDR; *clade defining region*) (PANDYA *et al.*, 2011).

Em 2000, HOLLINGSHEAD, BRICKS & BRILES investigaram a diversidade da PspA, e com base nas divergências das sequências de nucleotídeos da região α -hélice N-terminal, identificaram 3 famílias. Análises das regiões definidoras de *clade* permitiram subdividir as famílias em *clades*, que divergem entre si em mais de 20%, sendo evidenciado que genes *pspA* pertencentes a uma mesma *clade* apresentam uma identidade superior a 80%. Assim, de acordo com a diversidade dos genes que as codificam, as proteínas PspA foram classificadas em família 1 (contendo as *clades* 1 e 2), família 2 (contendo as *clades* 3, 4 e 5) e família 3 (contendo a *clade* 6) (HOLLINGSHEAD *et al.*, 2000; BRANDILEONE *et al.*, 2004; PIMENTA *et al.*, 2006). As famílias de PspA podem ser reconhecidas por testes genotípicos como o PCR, ou utilizando-se métodos sorológicos como o ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), enquanto que para a definição das *clades* é necessário o sequenciamento da região CDR dos genes *pspA* (MELIN *et al.*, 2008). Amostras de *S. pneumoniae* que expressam PspAs das famílias 1 e 2 constituem cerca de 98% dos isolados clínicos, enquanto que as da família 3 são raramente encontradas (OCHS *et al.*, 2008).

A diversidade observada entre as proteínas PspA de pneumococos é provavelmente resultante de eventos de recombinação homóloga que ocorrem em seus respectivos genes, cuja frequência previamente relatada varia entre 1 e 35% (PANDYA *et al.*, 2011). Esses eventos podem afetar um ou mais domínios da proteína, sendo que aproximadamente 50% deles geralmente ocorrem na região definidora de *clades* e na região rica em prolina (PANDYA *et al.*, 2011).

3 Epidemiologia das infecções pneumocócicas

Conforme já mencionado, *S. pneumoniae* é reconhecido como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em seres humanos (HENRIQUES-NORMARK & TUOMANEN, 2013). Em 2008, a Organização Mundial da Saúde estimou que anualmente ocorram 8,8 milhões de óbitos de crianças com idade inferior a 5 anos, sendo 500.000 causadas por infecções pneumocócicas, principalmente em países do continente Africano e Asiático (WHO, 2012). Já no Brasil, foi estimado que a incidência de doença pneumocócica invasiva (DPI) em crianças com idade inferior a 3 anos no período de 2007 a 2009 foi de 57,5 casos/100.000 habitantes (ANDRADE *et al.*, 2012).

Os pneumococos são considerados um dos agentes mais comuns de pneumonia adquirida na comunidade e uma das principais causas de meningite, bacteremia, otite

média aguda e sinusite (CDC, 1997; BUTLER, DOWELL & BREIMAN, 1998; WEISER, 2010), apresentando ocorrência particularmente alta em crianças com idade inferior a 5 anos, idosos e indivíduos imunocomprometidos (KADIOGLU *et al.*, 2008; HENRIQUES-NORMARK & TUOMANEN, 2013).

A transmissão do microrganismo ocorre geralmente através de aerossóis, provenientes de pacientes ou portadores assintomáticos, principalmente em ambientes com aglomeração de pessoas e entre indivíduos com contato próximo, o que facilita o contato direto entre a fonte infectante e a pessoa susceptível (GRAY & DILLON, 1986; MUSHER, 1992; HOSHINO *et al.*, 2002; WEISER, 2010; HENRIQUES-NORMARK & TUOMANEN, 2013). A colonização assintomática pelo pneumococo ocorre principalmente em crianças com idade inferior a 5 anos, apresentando taxas de 27% a 85% de prevalência (WHO, 2012). Em 2013, foram registradas 3,1 milhões de mortes em crianças desta faixa etária, das quais cerca de 90% ocorreram na África Subsaariana e no Sudeste da Ásia, sendo a pneumonia pneumocócica responsável por 465.000 mortes (IGME, 2014).

O Brasil se encontra entre os 15 países com maior incidência de pneumonia bacteriana, registrando 1,8 milhões de casos por ano, com *S. pneumoniae* sendo o principal agente etiológico, exceto no período neonatal (RUDAN *et al.*, 2008). No período de 2000 a 2008 foram registrados no Brasil 7.129.291 casos de pneumonia, sendo que 45% destas infecções ocorreram em menores de cinco anos de idade, resultando em uma frequência média anual de 2.100 internações/100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Já em 2011, 28,8% das amostras provenientes de casos de pneumonia pneumocócica no Brasil foram isoladas de crianças menores de 5 anos de idade (PAHO, 2011).

Após a introdução da vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b no Programa Nacional de Imunização em 1999, *S. pneumoniae* emergiu como a segunda maior causa de meningite bacteriana, sendo suplantado apenas pelas constantes epidemias de doença meningocócica, causadas pela espécie *Neisseria meningitidis* (BRANDILEONE *et al.*, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Entre os anos 2000 e 2008, a meningite pneumocócica representou 11% das meningites bacterianas no Brasil, apresentando uma incidência de 9,5 casos/100.000 habitantes, acometendo principalmente crianças com idade inferior a 1 ano de idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Já em 2012, foram registrados 880 casos confirmados de meningite

pneumocócica no Brasil, acometendo, principalmente, crianças com até 4 anos de idade e idosos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Dentre as infecções pneumocócicas não invasivas, a otite média aguda é a manifestação mais comum de infecção pneumocócica, correspondendo a 30-50% de todas as infecções de orelha média, principalmente em crianças menores de 5 anos de idade (FLETCHER & FRITZELL, 2012).

Entre os 98 sorotipos existentes na espécie *S. pneumoniae*, 15 são mais associados ao desenvolvimento de DPI e a sua ocorrência varia de acordo com a origem geográfica, a idade do paciente e a origem clínica da amostra (GARCÍA *et al.*, 2000; DI FABIO *et al.*, 2001; LAVAL *et al.*, 2006; HENRIQUES-NORMARK & TUOMANEN, 2013). Dentre esses 15 sorotipos, destacam-se os sorotipos 6B, 14, 19F e 23F por apresentarem uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrados em países da Europa, Ásia, África Subsaariana e nos Estados Unidos (RICHTER *et al.*, 2013; CHO *et al.*, 2014; PASINATO *et al.*, 2014; USUF *et al.*, 2014; OLARTE *et al.*, 2015).

Na América Latina, 13 tipos capsulares são responsáveis por mais de 85% dos casos invasivos, destacando-se os sorotipos 1 e 5, que são os mais prevalentes associados com DPI nessa região (GARCÍA *et al.*, 2000; DI FABIO *et al.*, 2001; LAVAL *et al.*, 2006; YOSHIOKA *et al.*, 2011; DUARTE, SANABRIA & MORENO, 2013).

No Brasil, os sorotipos frequentemente associados às doenças invasivas são 1, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, entre os quais os sorotipos 6A, 6B, 9V, 14, 19F e 23F se destacam por estarem associados à resistência aos antimicrobianos e também à colonização assintomática da nasofaringe (KLUGMAN & KOORNHOF, 1988; BRANDILEONE *et al.*, 2003; DAGAN *et al.*, 2003; LAVAL *et al.*, 2006; CAMARGOS *et al.*, 2006; KEGELE, 2008; MANTESE *et al.*, 2009; CAMARGO *et al.*, 2015).

4 Caracterização molecular

Para o correto rastreamento de amostras de *S. pneumoniae*, a determinação do tipo capsular é um passo importante e essencial. O método de Quellung é a metodologia de referência para a determinação dos tipos capsulares, apresentando alto valor diagnóstico, sendo importante no rastreamento das infecções pneumocócicas, principalmente para estudos epidemiológicos. Entretanto, somente laboratórios de referência são capazes de realizá-lo devido ao elevado custo, dificuldade de execução,

necessidade de pessoal altamente especializado e disponibilidade dos antissoros. Com isso, abordagens genéticas, como aquelas baseadas na técnica de PCR, são interessantes propostas para a definição dos tipos capsulares pneumocócicos. Essas técnicas permitem que a determinação dos tipos capsulares seja mais amplamente executada, facilitando a realização de estudos de vigilância epidemiológica (PAI, GERTZ & BEALL, 2006; DIAS *et al.*, 2007b; RAYNER *et al.*, 2015).

Além da determinação do tipo capsular, diversas outras técnicas moleculares foram desenvolvidas e têm sido empregadas na caracterização de amostras de *S. pneumoniae* com a tentativa de esclarecer aspectos de sua biologia, evolução e epidemiologia, contribuindo para um melhor entendimento sobre a complexa diversidade dos pneumococos. Dentre esses métodos, destacam-se a eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) (MOISSENET *et al.*, 1997), a análise dos perfis alélicos de genes de manutenção celular (MLST, *Multilocus Sequence Typing*) (ENRIGH & SPRATT, 1998), e a técnica de análise de polimorfismo numérico de sequências repetidas em múltiplos loci (MLVA, *Multiple-loci VNTR [Variable-Number of Tandem Repeat] Analysis*) (KOECK *et al.*, 2005). Essas metodologias vêm cada vez mais ganhando importância por permitirem o rastreamento de importantes clones de *S. pneumoniae* espalhados por diversas regiões geográficas, e desta forma, auxiliarem no conhecimento da dinâmica de populações microbianas ao longo do tempo (SADOWY *et al.*, 2006; SADOWY *et al.*, 2010).

Em 1997, com o estabelecimento da rede *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network* (PMEN), a aplicação de técnicas moleculares para a tipagem de pneumococos ganhou um impulso bastante considerável. A rede PMEN foi criada com o propósito de estabelecer métodos para caracterização, padronização, nomenclatura e classificação de clones de pneumococos resistentes a antimicrobianos e/ou associados a doenças invasivas distribuídos mundialmente (<http://www.sph.emory.edu/PMEN>; MCGEE *et al.*, 2001). São reconhecidos atualmente pelo PMEN 43 clones, destacando-se aqueles que surgiram na Espanha durante os anos 80 (FENOLL *et al.*, 1991), os quais estão associados aos sorotipos 6B (Spain^{6B}-2), 14 (Spain¹⁴-5), 23F (Spain^{23F}-1) e 9V (Spain^{9V}-3), e à resistência à penicilina ou multirresistência (TSOLIA *et al.*, 2002; PAYNE *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, a técnica de MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time Of Flight Mass Spectrometry*) vem ganhando destaque na Microbiologia, principalmente na área clínica, pelo fato da sua execução ser rápida,

fácil e apresentar baixo custo, além de ser eficiente. Seu uso para a identificação de espécies bacterianas clinicamente importantes baseia-se na geração de espectros de massas que são comparados àqueles depositados no banco de dados, o qual inclui espectros de referência de amostras bem caracterizadas. No entanto, por visar peptídeos altamente conservados, esta técnica apresenta limitações na discriminação entre espécies bacterianas intimamente relacionadas, como *S. pneumoniae* e outras espécies do grupo mitis (FRIEDERICHS *et al.*, 2007; IKRYANNIKOVA *et al.*, 2013; WERNO *et al.*, 2012; DUBOIS *et al.*, 2013).

Por outro lado, uma vez que a espectrometria de massas proporciona a geração de *fingerprints* representantes de um subproteoma celular, ela pode ser também utilizada com sucesso para a diferenciação de amostras pertencentes a uma mesma espécie bacteriana. A identificação de biomarcadores que sejam únicos e representativos de sorotipos ou clones particulares de pneumococos, por exemplo, possibilitaria que esses últimos pudessem ser rapidamente detectados. Neste sentido, Williamson e colaboradores (2007) identificaram, com a utilização de MALDI-TOF MS, biomarcadores específicos de uma linhagem de pneumococos não-tipáveis associada ao desenvolvimento de conjuntivite, demonstrando o potencial da técnica para este propósito.

A introdução de métodos de análise molecular trouxe importantes contribuições ao conhecimento de aspectos epidemiológicos, constituindo hoje uma ferramenta essencial para o rastreamento de *S. pneumoniae* e para basear propostas de controle das infecções pneumocócicas.

5 Tratamento e prevenção das infecções pneumocócicas

Para o tratamento das infecções pneumocócicas, a droga de escolha é a penicilina, exceto no caso de meningite, para qual o tratamento empírico é baseado na utilização de cefalosporinas de terceira geração, como a ceftriaxona, associada ou não com a vancomicina (COTTAGNOUD *et al.*, 2004).

O primeiro relato de amostras de *S. pneumoniae* não susceptíveis à penicilina (PNSP, *penicillin non-susceptible S. pneumoniae*) ocorreu em 1967 na Austrália (HANSMANN & BULLEN, 1967). Desde então, os números de PNSP vêm aumentando em diversas regiões geográficas.

Em um estudo recente foi constatado que PNSP correspondiam a 14,8% do total de amostras de pneumococos isoladas em diferentes partes do mundo, sendo que em

países da Ásia foi observado o percentual de 30,1%, seguido de países da África (27,6%), Médio Oriente (25,2%), América do Norte (15,4%) e por último a América Latina (14,1%) (TOMIC & DOWZICKY, 2014). Em 2013, foram registrados nos países representantes da União Europeia, níveis de PNSP de 14,7%, sendo que os países que apresentaram índices mais elevados foram a República de Malta (42,9%), República de Chipre (40%), Polônia (32,3%) e Espanha (30,1%) (EARSS, 2014).

Já no Brasil, em 2011, foi observada uma taxa de resistência à penicilina de 26,7% entre amostras isoladas de casos de meningite (PAHO, 2011). Entre os anos 1990 e 2008 foi observado um significativo aumento de taxas de resistência neste tipo de amostra nas cidades de Salvador e Rio de Janeiro de 15% para 22% e 3,5% para 20%, respectivamente (MENEZES *et al.*, 2010; BARROSO *et al.*, 2012). Além disso, estudo realizado com amostras isoladas de crianças carreadoras assintomáticas, na cidade de Niteroi no Estado de Rio de Janeiro, demonstrou uma taxa de resistência à penicilina de 27,3% (NEVES *et al.*, 2013).

Estudos demonstram que os índices de resistência mais elevados entre amostras de *S. pneumoniae* são relacionados a combinação sulfametoxazol-trimetoprim e a tetraciclina. Também são relatadas taxas significativas de resistência a eritromicina e clindamicina, e, de forma esporádica, a não susceptibilidade a cefalosporinas e quinolonas (COTTAGNOUD *et al.*, 2004; GOULD *et al.*, 2007; MANTESE *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2010; TOMIC & DOWZICKY, 2014).

A importância das doenças pneumocócicas e o aumento da resistência bacteriana tiveram um papel crucial para o desenvolvimento de vacinas para prevenção dessas infecções, principalmente em pessoas pertencentes aos grupos de risco, incluindo crianças, idosos e imunocomprometidos. A cápsula polissacarídica, por ser o principal fator de virulência de *S. pneumoniae*, tornou-se um importante alvo no desenvolvimento de vacinas pneumocócicas. Assim, as primeiras vacinas desenvolvidas foram baseadas na utilização de polissacarídeos capsulares (GENO *et al.*, 2015).

Atualmente, as formulações vacinais disponíveis no mercado são a vacina polissacarídica 23-valente e vacinas polissacarídicas conjugadas 7-valente, 10-valente e 13-valente (BOGAERT *et al.*, 2004b, YOSHIOKA *et al.*, 2011; FELDMAN & ANDERSON, 2014).

A vacina 23-valente foi licenciada para uso nos EUA no ano de 1983, e compreende os sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F, apresentando uma cobertura de aproximadamente

85-90% das cepas circulantes. No entanto, esta vacina apresenta importantes limitações, uma vez que é fracamente imunogênica em idosos e imunocomprometidos e não induz uma resposta imune satisfatória em crianças menores de 2 anos (BOGAERT *et al.*, 2004a; FLETCHER *et al.*, 2014).

A vacina conjugada 7-valente (Prevenar®, Wyeth) foi licenciada para uso nos EUA em 2000 e em alguns países Europeus no ano de 2006 (FLETCHER *et al.*, 2014). Esta vacina inclui os tipos capsulares 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, e foi baseada nos sorotipos mais comumente encontrados causando infecções invasivas nos EUA e em países da Europa (BRANDILEONE *et al.*, 2003). No entanto, ela não foi incorporada ao calendário Brasileiro de imunização.

A vacina 10-valente (Synflorix®, GlaxoSmithKline) confere proteção adicional aos sorotipos 1, 5 e 7F, e foi introduzida no Programa Nacional de Imunizações em 2010, oferecendo uma cobertura vacinal de cerca de 80% (MENEZES *et al.*, 2010). Já a vacina 13-valente (Prevenar®, Wyeth) estende a cobertura vacinal aos sorotipos 3, 6A e 19A, e vem sendo utilizada em substituição à vacina 7-valente nos EUA e na Europa (RODGERS & KLUGMAN, 2011; VAN DE VOOREN *et al.*, 2014).

A colonização assintomática do trato respiratório superior pelo pneumococo precede as infecções invasivas, e têm sido relatadas na literatura evidências de mudanças na prevalência de sorotipos colonizando a nasofaringe de crianças, notando-se a substituição de sorotipos vacinais por sorotipos ausentes nas vacinas conjugadas, destacando-se os sorotipos 19A e 35B (RICHTER *et al.*, 2009; ZUCCOTTI *et al.*, 2014; GENO *et al.*, 2015). Essa mudança vem sendo verificada em países onde a vacina conjugada faz parte do programa de vacinação governamental (PLETZ *et al.*, 2008; ZUCCOTTI *et al.*, 2014).

Anticorpos contra a cápsula apresentam-se eficazes contra a infecção. No entanto, a proteção induzida por essas vacinas é sorotipo-específica, gerando limitações em função da ampla diversidade de tipos capsulares de *S. pneumoniae* (BOGAERT *et al.*, 2004b). Por este motivo, um grande interesse tem sido direcionado para o desenvolvimento de vacinas baseadas em proteínas pneumocócicas que contribuem para a patogênese e que são comuns a todos os sorotipos (MIYAJI *et al.*, 2013). Essas proteínas, sendo antígenos que induzem resposta dependentes de células T, demonstram ser altamente imunogênicas e são capazes de ativar memória imunológica em crianças (OGUNNIYI *et al.*, 2007; MIYAJI *et al.*, 2015).

A proteína PspA tem sido extensivamente estudada como alvo vacinal devido a sua ocorrência em quase todas as amostras de pneumococos e pela evidência de proteção em estudos com modelos animais, nos quais anticorpos anti-PspA foram capazes de proteger camundongos contra pneumonia, sepse e colonização (McDANIEL *et al.*, 1998; BRILES *et al.*, 2003; SHARMAA *et al.*, 2013; GENSCHMER *et al.*, 2014).

A maioria dos estudos de imunização com PspA visa a região gênica associada a CDR e a região rica em prolina, já que estes epítomos estão altamente acessíveis aos anticorpos. Oliveira e colaboradores (2010) demonstraram que uma vacina baseada na *clade* 5 combinada com células íntegras de *Bordetella pertussis* confere proteção contra infecções pneumocócicas em camundongos. Já em 2013, esse mesmo grupo demonstrou que uma vacina PspA/*clade* 5 combinada com toxoides tetânico/diftérico e contendo baixos níveis de LPS de *B. pertussis* foi capaz de induzir a produção de níveis elevados de anticorpos anti-PspA (LIMA *et al.*, 2013).

Além disso, outras abordagens vacinais baseadas em PspA vêm sendo estudadas, incluindo vacinas de DNA (FERREIRA *et al.*, 2006) e uso de vetores como células de *Salmonella* (FREY *et al.*, 2013), de bactérias ácido-láticas (CAMPOS *et al.*, 2008; XIN *et al.*, 2009) e de nanopartículas (HAUGHNEY *et al.*, 2013). Neste último, os pesquisadores observaram que a proteína liberada das nanopartículas teve a sua estrutura primária e secundária, assim como a sua antigenicidade conservada. Além disso, os pesquisadores também observaram que quando as formulações de nanopartículas/PspA foram administradas por via subcutânea em camundongos, houve indução de forte resposta anti-PspA (HAUGHNEY *et al.*, 2013).

Fato interessante é que já foi relatado na literatura que espécies relacionadas a *S. pneumoniae*, como *S. mitis*, podem conter genes *pspA*, demonstrando que, ao contrário do que se pensava anteriormente, esta proteína não é única e exclusiva de amostras de pneumococos (DENAPAITTE *et al.*, 2010). A presença de proteínas de superfície de *S. pneumoniae* em outros estreptococos do grupo *mitis* corrobora o alto relacionamento genético já reconhecido entre as espécies integrantes deste grupo, e tem uma importante implicação no desenvolvimento de novas vacinas baseadas nessas proteínas (DONATI *et al.*, 2010; MADHOUR *et al.*, 2011).

Considerando que PspAs de diferentes famílias apresentam reação cruzada restrita, é proposto que as vacinas constituídas por PspA devam incluir as principais famílias e/ou *clades* dessa proteína. Portanto, para avaliar a adequação da PspA como

possível antígeno vacinal será necessário primeiramente identificar as famílias e *clades* de PspA prevalentes entre as amostras isoladas de diversas regiões geográficas no mundo, levando em consideração, principalmente, os sorotipos e os complexos clonais circulantes.

OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral investigar a ocorrência e a diversidade de genes *pspA* entre amostras de *Streptococcus pneumoniae* representantes de diferentes clones de circulação prevalente em nosso meio, obtidas de diferentes origens clínicas e geográficas no Brasil.

Os objetivos específicos foram:

- Determinar as famílias e *clades* de genes *pspA*;
- Investigar a distribuição dos tipos de genes *pspA* ao longo do tempo e sua associação com a origem clínica das amostras, assim como suas características, tais como susceptibilidade a penicilina, tipos capsulares e complexos clonais;
- Investigar a presença de genes *pspA* em amostras representativas das espécies relacionadas *Streptococcus pseudopneumoniae* e *Streptococcus mitis*;
- Analisar a relação filogenética entre as diferentes *clades* de genes *pspA*;
- Avaliar, por metodologia *in silico*, a ocorrência de eventos de recombinação nos genes *pspA*;
- Avaliar a ocorrência e distribuição de biomarcadores de acordo com os diferentes tipos de genes *pspA* após caracterização por MALDI-TOF MS.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 Amostras bacterianas

No presente estudo foram analisadas 413 amostras de *S. pneumoniae* (Anexo 1) isoladas de pacientes com infecções pneumocócicas ou de portadores assintomáticos, entre 1988 e 2014, em diferentes estados do Brasil. Tais amostras foram identificadas e caracterizadas quanto ao tipo capsular, ao perfil de susceptibilidade à penicilina e ao complexo clonal por MLST e/ou MLVA durante estudos prévios ou concomitantes a este, realizados em nosso laboratório (MOURA, 2010; NEVES *et al.*, 2013).

Foram utilizadas 8 amostras de referência de *S. pneumoniae* como controles nos experimentos para determinação das famílias e *clades* de genes *pspA* (**Tabela 1**).

Também foram incluídas 6 amostras de *Streptococcus mitis* e 3 amostras de *Streptococcus pseudopneumoniae*, as quais foram isoladas na cidade de Niterói no ano de 2010 da nasofaringe de crianças assintomáticas.

Todas as amostras fazem parte da Coleção de Culturas do Laboratório de Apoio Biotecnológico e encontram-se estocadas sob a forma de suspensões densas em solução de preservação constituída por Skim-Milk (Difco, EUA) a 10% e glicerol a 20% (Sigma, EUA), mantidas em tanques de nitrogênio líquido.

Tabela 1-Características das amostras de *Streptococcus pneumoniae* utilizadas como controles para a determinação das famílias e *clades* de genes *pspA*

Amostra	Sorotipo	Família <i>pspA</i>	Clade <i>pspA</i>
BG 9739	4	1	1
DBL 1	6B	1	1
EF 10197	3	1	2
AC 122	9V	2	3
BG 11703	18	2	4
BG 7561	15	2	4
ATCC 6303	3	2	5
BG 6380	37	3	6

2 Extração do DNA bacteriano

A obtenção do DNA bacteriano foi realizada utilizando a resina Chelex 100® (Bio-Rad Laboratories, EUA), de acordo com o protocolo descrito por Pinto e colaboradores (2013). A partir do crescimento obtido em placas de agar sangue após incubação a 37°C durante 18 a 24 h, foi preparada, para cada amostra, uma suspensão bacteriana densa em tubo contendo 200 µL de solução Chelex 5% contendo 20 mg/ml de proteinase K. Cada suspensão foi incubada a 56°C por 1 h, homogeneizada durante 10 s, aquecida a 95°C durante 10 min, e homogeneizada novamente por mais 10s. Por fim, cada suspensão foi submetida à centrifugação a 10.000 g por 3 min. Os sobrenadantes gerados foram utilizados como fonte de DNA molde para as reações de amplificação.

3 Determinação das famílias de genes *pspA*

Esta etapa foi realizada para as 413 amostras incluídas no presente estudo. Para a determinação da família de genes *pspA* foi utilizado um protocolo adaptado a partir daqueles descritos por PIMENTA *et. al* (2006) e ROLO *et. al* (2009), conforme a seguir.

Cada mistura de reação, no volume final de 25 µL, foi constituída de 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1U de *Platinum Taq* polimerase, tampão da enzima 1X, 3 mM de MgCl₂, 25 µM de cada iniciador (**Tabela 2**) e 1 µL de DNA molde. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA). Foi empregada a seguinte programação: desnaturação inicial de 3 min a 95°C, seguida de 30 ciclos de 1 min a 95°C para desnaturação, 1 min a 55°C para anelamento e 3 min a 72°C para extensão. Quando não houve reação positiva, a temperatura de anelamento foi modificada para 58°C e/ou 62°C.

Os amplicons obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X sob uma corrente constante de 100 V por 1 h. O tamanho de cada fragmento foi estimado adicionando-se, a cada gel, o marcador molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA). Após coloração com brometo de etídio a 0,5 µg/ml por 15 min, os géis foram visualizados sob luz ultravioleta utilizando o sistema MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Israel) e armazenados digitalmente com o auxílio do software GelCapture (DNR Bio-Imaging Systems).

Tabela 2-Iniciadores utilizados na amplificação dos genes *pspA* de *Streptococcus pneumoniae* no presente estudo

Pares de iniciadores	Genes <i>pspA</i> detectados	Sequências 5'-3'	Tamanho do produto de amplificação ^a	Referência
LSM12	Família 1	CCGGATCCAGCGTCGCTATCTTAGGGGCTGGTT	1000 pb	SWIATLO <i>et al.</i> , 1997
SKH63		TTTCTGGCTCATY*AACTGCTTTC		PAYNE <i>et al.</i> , 2005
LSM12	Família 2	CCGGATCCAGCGTCGCTATCTTAGGGGCTGGTT	1200 pb	SWIATLO <i>et al.</i> , 1997
SKH52		TGGGGGTGGAGTTTCTTCTTCATCT		PAYNE <i>et al.</i> , 2005
SKH41	Família 3	CGCACAGACTTAACAGATGAAC	1300 pb	HOLLINGSHEAD <i>et al.</i> , 2006
SKH42		CTTGTCCATCAACTTCATCC		
LSM12	Todas as famílias	CCGGATCCAGCGTCGCTATCTTAGGGGCTGGTT	1400 pb	SWIATLO <i>et al.</i> , 1997
SKH2		CCACATACCGTTTTCTTGTTTCCAGCC		HOLLINGSHEAD <i>et al.</i> , 2000

*C ou T

^apb, pares de bases

4 Determinação das *clades* de genes *pspA*

Esta etapa foi realizada com um conjunto de 82 amostras (incluindo 81 de *S. pneumoniae* e uma de *S. mitis*) selecionadas a partir dos resultados obtidos na etapa relativa ao item anterior e de acordo com os complexos clonais prevalentes neste estudo. Para a determinação das *clades*, as regiões CDR dos genes *pspA* foram amplificadas e sequenciadas. A amplificação foi realizada utilizando o par de iniciadores LSM12/SKH2 (**Tabela 2**) conforme descrito no item anterior. Os produtos de amplificação foram purificados utilizando o reagente ExoSAP-IT (Affymetrix-USB, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

A seguir, foram adicionados 50-100 ng do DNA purificado, 5 µM do iniciador SKH2 e 1 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) de forma a totalizar um volume final de 8 µL. Essa mistura foi submetida ao ciclo de sequenciamento, utilizando o termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). As sequências dos fragmentos amplificados foram determinadas utilizando-se o equipamento ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As sequências geradas foram editadas e alinhadas com auxílio dos softwares BioEdit v7.0.9.0 (HALL, 1998) e CodonCode Aligner v3.7.1. Utilizando o BioEdit v7.0.9.0, foram também calculadas as porcentagens de identidade nucleotídica entre sequências representantes de uma mesma *clade*, entre sequências pertencentes a diferentes *clades* e entre as sequências de *S. pneumoniae* e *S. mitis*. Com auxílio do software MEGA6 foram construídas árvores filogenéticas através do algoritmo *Neighbor Joining*. As *clades* foram determinadas através da ferramenta online BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

5 Detecção dos eventos de recombinação nos genes *pspA*

Nesta etapa foram avaliados os fragmentos correspondentes à CDR e à região rica em prolina (**Figura 1**) dos genes *pspA*. Das 82 amostras que tiveram as suas *clades* determinadas, foram selecionadas 31 de amostras de *S. pneumoniae*, de modo a representar as diferentes famílias e *clades* e os complexos clonais prevalentes neste estudo, assim como de uma amostra pertencente a espécie *S. mitis*.

Para tal, as sequências geradas no item anterior, após edição e alinhamento, foram analisadas com auxílio da ferramenta *Recombination Detection Program* (RDP4), na qual foi utilizado um pacote contendo os seguintes testes preditivos:

Geneconv, Maxchi, Chimaera, 3Seq, Bootscan e Siscan. Foram considerados significativos os eventos de recombinação que apresentaram valor de $p < 0,05$ em pelo menos um dos testes individuais utilizados.

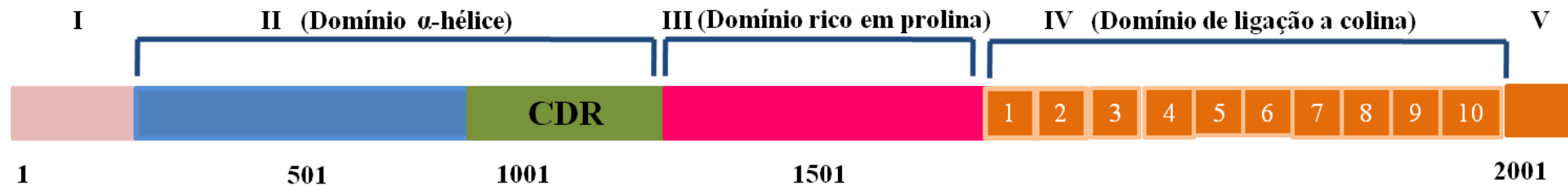


Figura 1-Representação esquemática das subunidades que constituem a proteína PspA e posições de nucleotídeos no seu respectivo gene. Parte superior da figura: domínios da proteína PspA, incluindo I: peptídeo sinal; II: domínio α-hélice, incluindo a região definidora de *clade* (CDR); III: domínio rico em prolina; IV: domínio de ligação a colina, contendo 10 unidades de repetição, cada uma com 20 aminoácidos conservados; V: região C-terminal. Parte inferior da figura: posições dos nucleotídeos no fragmento do gene *pspA* em relação a cada domínio da proteína.

6 Caracterização por MALDI-TOF MS

Esta etapa foi realizada para 272 amostras de *S. pneumoniae* selecionadas a partir dos resultados obtidos nas etapas relativas aos itens anteriores e de acordo com os complexos clonais prevalentes neste estudo. As amostras foram semeadas em placas de ágar sangue e incubadas a 37°C por 18-24 h em atmosfera contendo 5 % de CO₂. A partir do crescimento obtido, algumas colônias foram depositadas em tubos Protein LoBind (Eppendorf, Alemanha) onde foram adicionados 5 µL de ácido fórmico 70 % e 5 µL de acetonitrila (Tedia, EUA). Após centrifugação a 5000 g por 3 min, 1 µL do sobrenadante foi aplicado em áreas demarcadas da placa de aço inoxidável polida fornecida pelo fabricante do equipamento (MSP 96 *target polished steel* BC, Bruker Daltonics, Alemanha) e coberto com 1 µL da matriz HCCA [constituída por uma solução de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico a 10mg/ml em acetonitrila a 50% e ácido tricloroacético a 2,5%].

Os espectros foram gerados com auxílio do espectrômetro de massa Microflex LT (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando o software FlexControl no modo automático (MBT_FC.par). A calibração do aparelho foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Os espectros obtidos foram analisados com auxílio do software BioNumerics v7.1 (Applied Maths, Bélgica), com o qual foi realizada a construção de diagramas baseados no coeficiente de Pearson e no algoritmo *Neighbor Joining*. Além disso, foi determinado um perfil de biomarcadores, representados por posições massa/carga (m/z) ou picos de interesse nos espectros, para a diferenciação dos tipos de genes *pspA*. A predição de possíveis peptídeos e proteínas representativos de cada um desses biomarcadores foi realizada através da pesquisa no banco de dados de proteínas de *Streptococcus pneumoniae* disponível em <http://biocyc.org/> (*BioCyc Database Collection*). Foram considerados os peptídeos com valores de massa molecular (em Da) mais aproximados ao equivalente das posições m/z .

7 Análises *in silico*

Utilizando os perfis alélicos obtidos previamente com a técnica de MLST e MLVA (COSTA, 2012), diagramas foram gerados pelo método *Minimum Spanning Tree* (MST) com auxílio do software BioNumerics v7.1 (Applied Maths, Bélgica).

8 Análises estatísticas

Foram realizadas com o auxílio do software Prism6 (GraphPad Software, EUA) utilizando os testes chi-quadrado e ANOVA. O nível de significância de 95% foi utilizado para a hipótese nula ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Todas as 413 amostras de *S. pneumoniae* avaliadas albergavam genes *pspA*; sendo 39% (161 amostras) representantes da família 1, 59,6% (246 amostras) representantes da família 2, e 1,4% (6 amostras) representantes da família 3.

Entre as 35 amostras da família 1 selecionadas para a determinação de *clades*, 88,6% (31 amostras) pertenciam a *clade* 1 enquanto 11,4% (4) pertenciam a *clade* 2. Entre as 40 amostras da família 2 avaliadas, 85% (34) pertenciam a *clade* 3, 10% (4) pertenciam a *clade* 4 e 5% (2) a *clade* 5. Todas as seis amostras da família 3 pertenciam a *clade* 6.

Índices de similaridade maiores que 80% foram observados entre as sequências da CDR dos genes *pspA* de amostras representantes de uma mesma *clade*, sendo as pertencentes a *clade* 5 consideradas a mais homogêneas e as da *clade* 6 as mais heterogêneas (**Tabela 3**). Já entre sequências pertencentes a *clades* diferentes, a identidade entre as sequências variou de 22% (entre amostras das *clades* 5 e 6) a 77% (entre as das *clades* 1 e 2), sendo a diversidade geralmente maior entre *clades* pertencentes a famílias diferentes. A árvore filogenética demonstrando o relacionamento entre amostras representantes de diferentes *clades* incluídas no presente estudo encontra-se ilustrada na **Figura 2**.

Não foi observada associação significativa entre tipo de gene *pspA* e os principais sorotipos/sorogrupos (**Figura 3**; $p=0,3996$), origem clínica (**Figura 4**; $p=0,1495$) ou perfil de susceptibilidade à penicilina das amostras (**Figura 5**; $p=0,2865$). No entanto, apesar da predominância, em geral, dos genes da família 2, genes da família 1 foram mais prevalentes entre as amostras do sorogrupo 6 (**Figura 3**) e entre as amostras susceptíveis à penicilina (**Figura 5**). Da mesma forma, genes da família 3 se destacaram somente entre as amostras NT.

Por outro lado, foi evidente a associação entre o tipo de gene *pspA* e o complexo clonal definido por MLST e MLVA, sendo os genes conservados em nível de família e *clade* dentro de cada clone avaliado no presente estudo. As amostras pertencentes à família 1 e *clade* 1 foram associadas com os complexos clonais 15, 3930 3 5401. Já as amostras pertencentes a família 2 e *clade* 3 foram associadas aos CC156 e CC66 (**Figuras 6 e 7**).

Tabela 3-Identidade nucleotídica média entre as sequências da região definidora de clade (CDR) dos genes *pspA* entre as amostras de *Streptococcus pneumoniae* representantes das diferentes *clades* e a amostra de *Streptococcus mitis* incluídas no presente estudo

	<i>Clade 1</i>	<i>Clade 2</i>	<i>Clade 3</i>	<i>Clade 4</i>	<i>Clade 5</i>	<i>Clade 6</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Clade 1</i>	88%	77%	45%	37%	30%	36%	28%
<i>Clade 2</i>		93%	42%	38%	28%	35%	28%
<i>Clade 3</i>			95%	63%	28%	34%	28%
<i>Clade 4</i>				93%	28%	28%	26%
<i>Clade 5</i>					96%	22%	29%
<i>Clade 6</i>						81%	28%

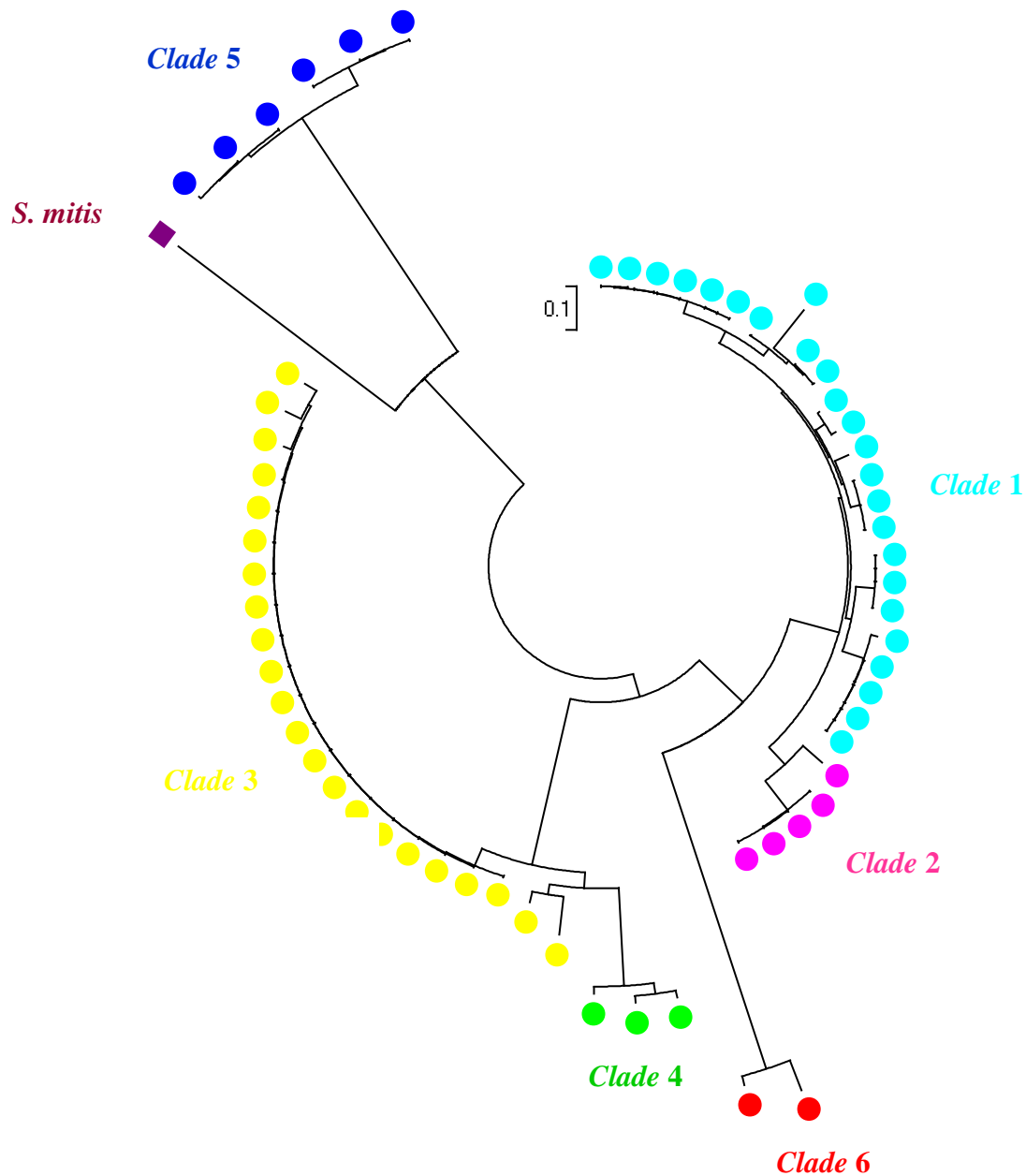


Figura 2—Árvore filogenética baseada no algoritmo *Neighbor Joining*, construída a partir das sequências nucleotídicas das regiões definidoras de *clade* (CDR) de amostras representativas de cada *clade* incluídas no presente estudo.

Círculos em azul claro: *clade* 1; círculos em rosa: *clade* 2; círculos em amarelo: *clade* 3; círculos em verde: *clade* 4; círculos em azul escuro: *clade* 5; círculos em vermelho: *clade* 6; quadrado em violeta: *Streptococcus mitis*.

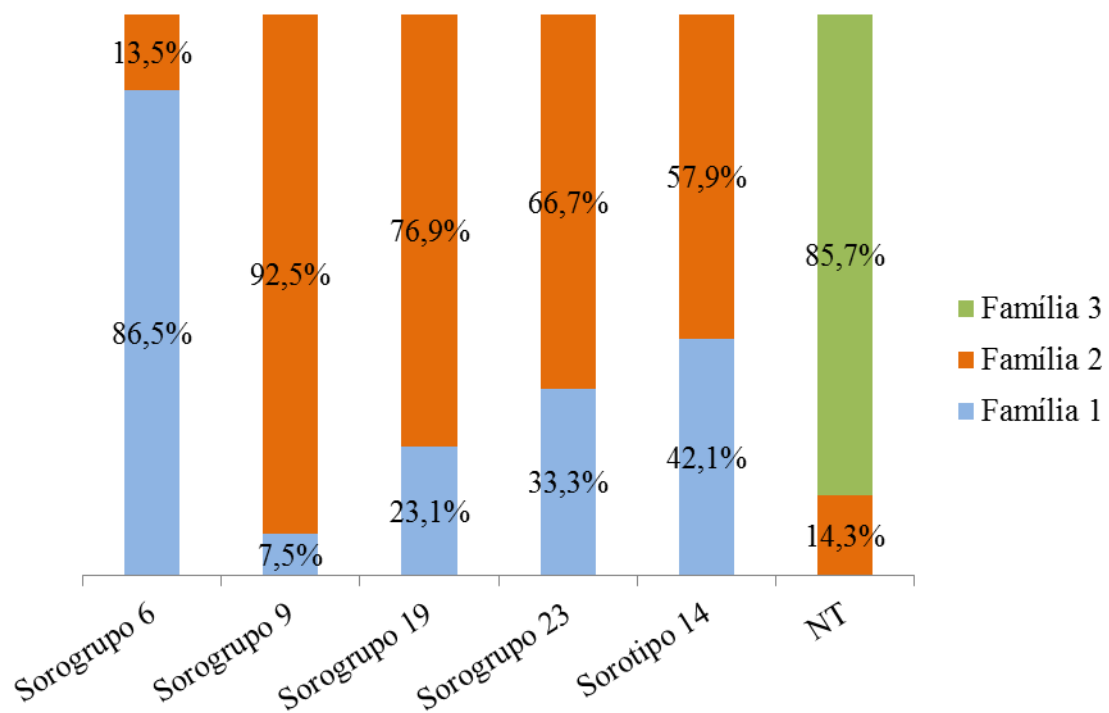


Figura 3- Distribuição das famílias de genes *pspA* de acordo com os principais sorotipos/sorogrupos observados entre as amostras de *Streptococcus pneumoniae* incluídas no presente estudo
NT, não sorotipável.

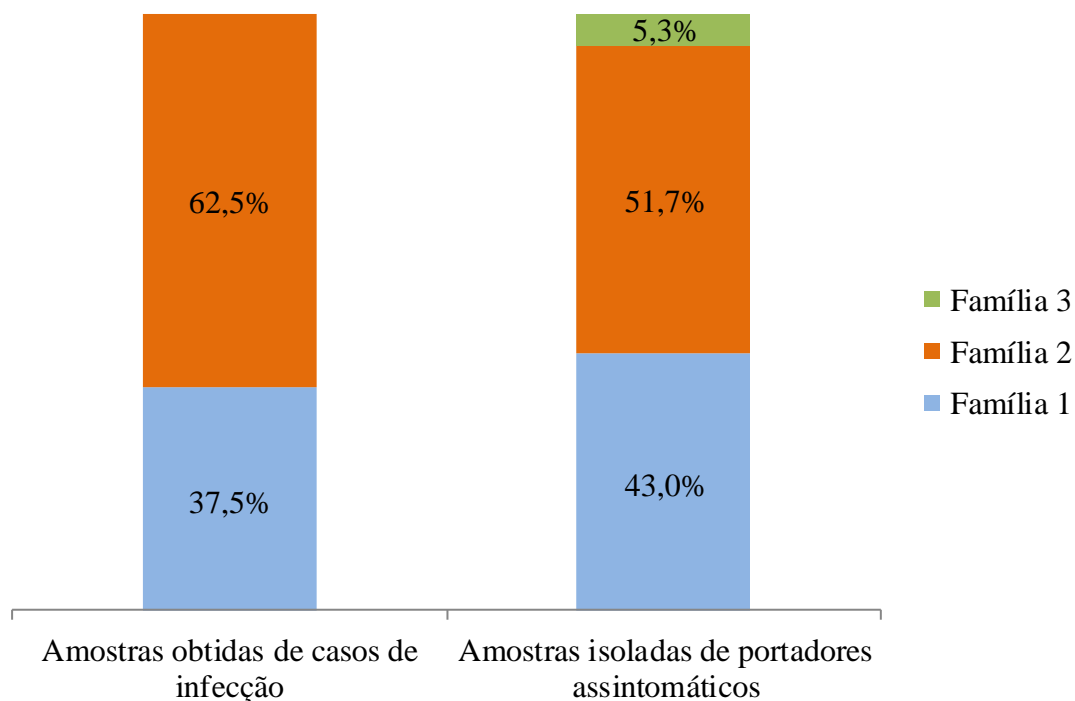


Figura 4-Distribuição das famílias de genes *pspA* de acordo com a origem clínica das amostras de *Streptococcus pneumoniae* incluídas no presente estudo.

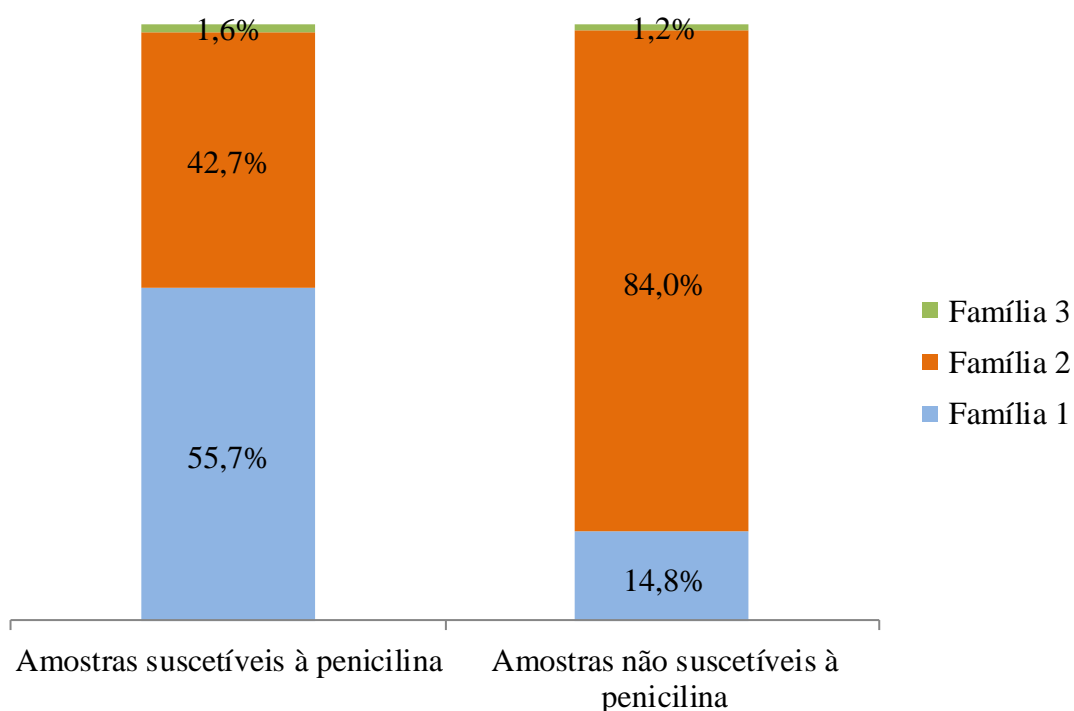


Figura 5-Distribuição das famílias de genes *pspA* de acordo com o perfil de susceptibilidade à penicilina das amostras de *Streptococcus pneumoniae* incluídas no presente estudo

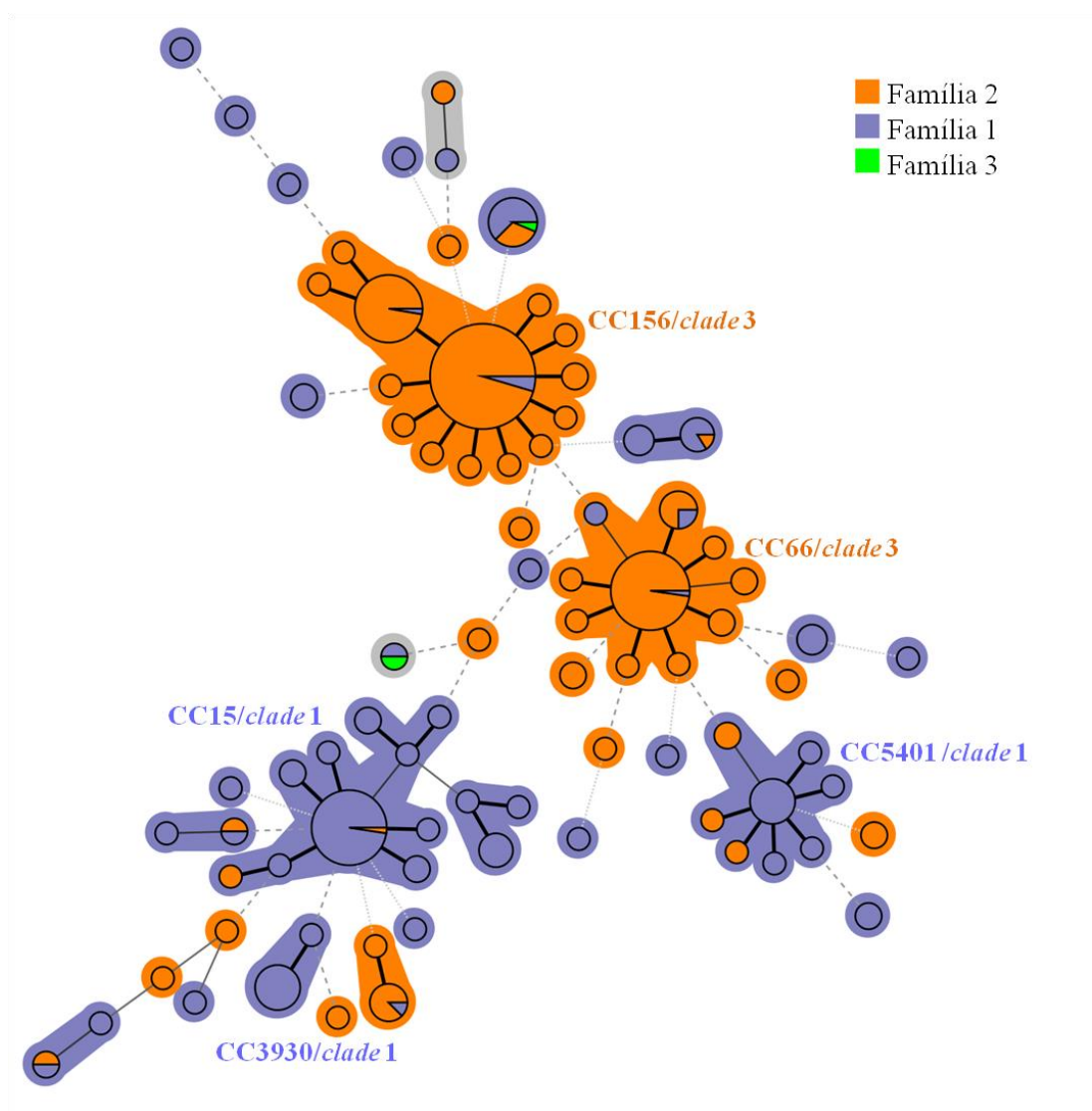


Figura 6-Diagrama *Minimum Spanning Tree* (MST) demonstrando os complexos clonais (CCs) contruídos a partir dos perfis alélicos obtidos por MLST de 390 amostras de *Streptococcus pneumoniae* incluídas no presente estudo

Os principais CCs estão indicados. Cada nó representa um ST (*Sequence Type*) e o seu tamanho corresponde ao número de amostras representadas por ele. Os CCs e suas respectivas amostras estão ilustrados por regiões sombreadas (azul ou laranja), coloridas de acordo com a família de genes *pspA* prevalente. As linhas entre os nós denotam o relacionamento genético entre os STs conforme a seguir: linhas pretas contínuas e grossas indicam diferença de um único locus; linhas pretas contínuas e finas indicam diferença de dois loci; e linhas pontilhadas indicam diferença de 3 loci ou mais.

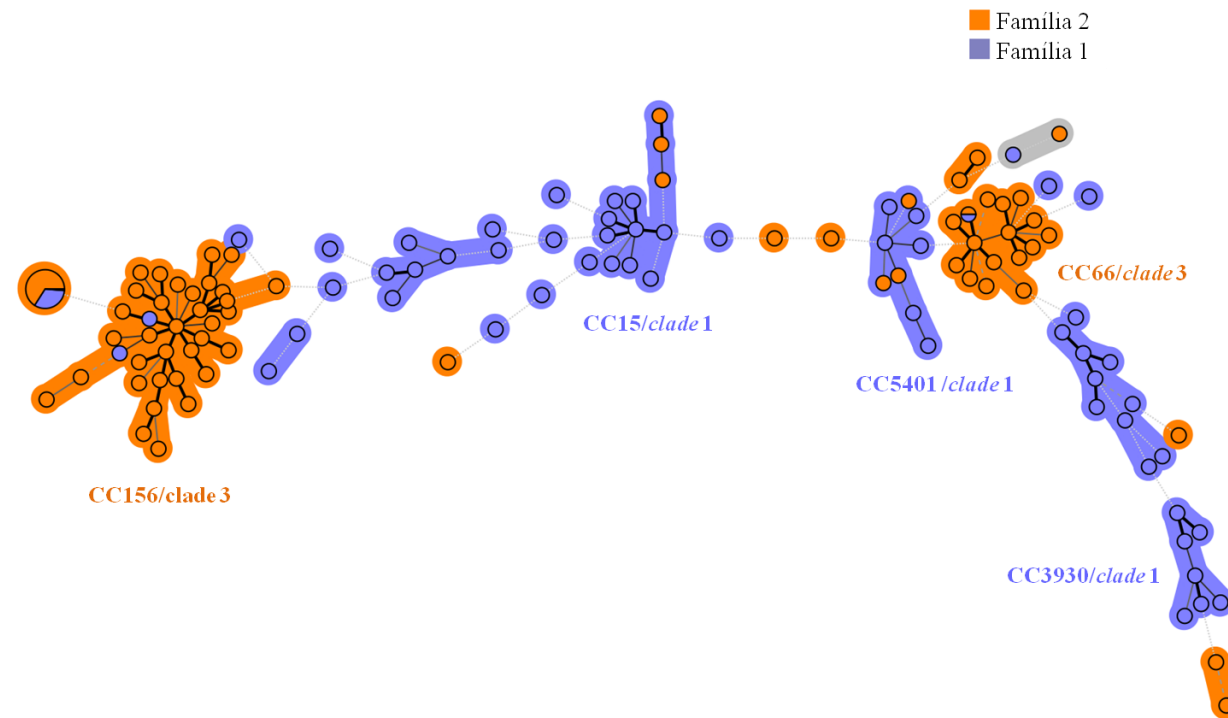


Figura 7-Diagrama *Minimum Spanning Tree* (MST) demonstrando os complexos clonais (CCs) contruídos a partir dos perfis alélicos obtidos por MLVA de 172 amostras de *Streptococcus pneumoniae* incluídas no presente estudo

Os principais CCs estão indicados. Cada nódulo representa um tipo de MLVA e o seu tamanho corresponde ao número de amostras representadas por ele. Os CCs e suas respectivas amostras estão ilustrados por regiões sombreadas (azul ou laranja), coloridas de acordo com a família de genes *pspA* prevalente. As linhas entre os nódulos denotam o relacionamento genético entre os tipos de MLVA conforme a seguir: linhas pretas contínuas e grossas indicam diferença de um único locus; linhas pretas contínuas e finas indicam diferença de dois loci; e linhas pontilhadas indicam diferença de 3 loci ou mais.

Representantes das famílias 1 e 2 de genes *pspA* foram detectadas entre amostras isoladas desde os anos iniciais incluídos no presente estudo (1989 e 1988, respectivamente), sendo que a tendência ao longo do tempo (1988-2014) revelou o aumento da prevalência de amostras da família 2 acompanhado pela redução daquelas representantes da família 1 (**Figura 8**). Além disso, amostras portadoras de genes *pspA* da família 3 foram detectadas nos anos de 2009, 2010 e 2011.

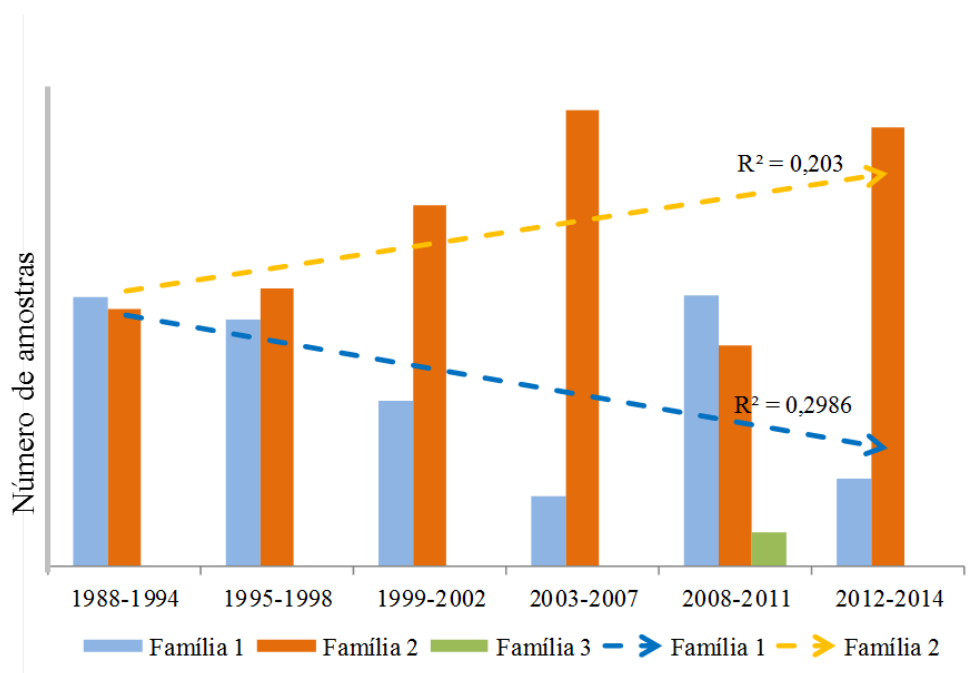


Figura 8-Distribuição das famílias de genes *pspA* no intervalo de tempo (em anos) abordado no presente estudo

Nenhuma das 3 amostras de *S. pseudopeumoniae* avaliadas apresentou genes *pspA* e somente uma amostra de *S. mitis* entre as 6 analisadas albergava esses genes, os quais foram classificados como pertencentes a família 1. No entanto, a classificação em *clades* não foi possível devido ao baixo relacionamento genético com as sequências de pneumococos, não ultrapassando 29% de identidade nucleotídica (**Figura 2** e **Tabela 3**).

Entre as 31 amostras de *S. pneumoniae* analisadas com o software RDP4, 23 apresentaram pelo menos um sinal de recombinação nos genes *pspA*. Treze tipos de eventos de recombinação foram observados (**Figura 9**), sendo o evento 1 o mais comum (ocorrendo em 7 amostras). As amostras apresentaram eventos de recombinação somente em fragmentos da CDR (6,5% das amostras), somente em fragmentos da região rica em prolina (22,6% das amostras) ou em fragmentos de ambas as regiões (38,7% das amostras). Entre os 23 recombinantes detectados foram observadas amostras representantes de todas as seis *clades*. Além disso, foram constatados dois sinais de recombinação na amostra de *S. mitis* analisada (**Figura 9**), um envolvendo o fragmento correspondente à CDR (evento 4) e outro envolvendo o fragmento correspondente à região rica em prolina (evento 10) do gene *pspA*. Esses sinais foram também compartilhados por amostras de *S. pneumoniae* incluídas no estudo.

A análise dos espectros gerados pela caracterização por MALDI-TOF MS permitiu distribuir as 272 amostras de *S. pneumoniae* em diferentes subgrupos, os quais, de forma geral, mas não de maneira absoluta, correlacionaram-se com a família de genes *pspA* e com os respectivos complexos clonais (**Figura 10**). Além disso, diferenças puderam ser observadas entre os espectros representativos das seis diferentes *clades* de *pspA* (**Figura 11**). Desta forma, perfis contendo nove biomarcadores selecionados, representados por posições ou picos de interesse nos espectros analisados, foram determinados para a diferenciação das seis diferentes *clades* (**Tabela 4 e Figura 12**). Esses biomarcadores foram identificados de forma preditiva como proteínas hipotéticas ainda sem função descrita ou como proteínas constitutivas do microrganismo (**Tabela 5**).

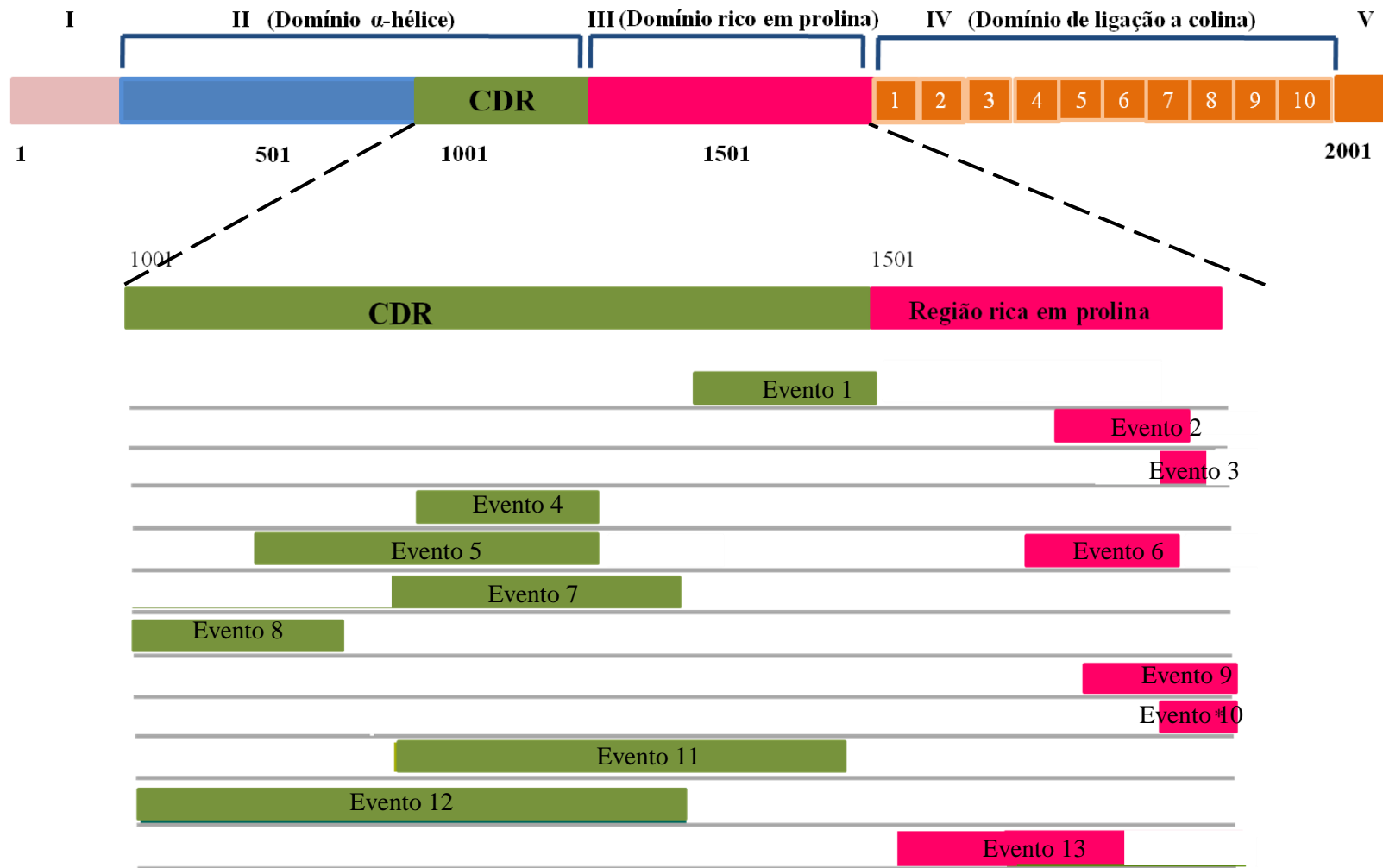


Figura 9-Representação dos 13 diferentes eventos de recombinação detectados pelo software RDP4 em fragmentos dos genes *pspA* de 31 amostras de *Streptococcus pneumoniae* incluídas no presente estudo.

Os eventos 4 e 10 também foram detectados na amostra de *Streptococcus mitis* analisada.g

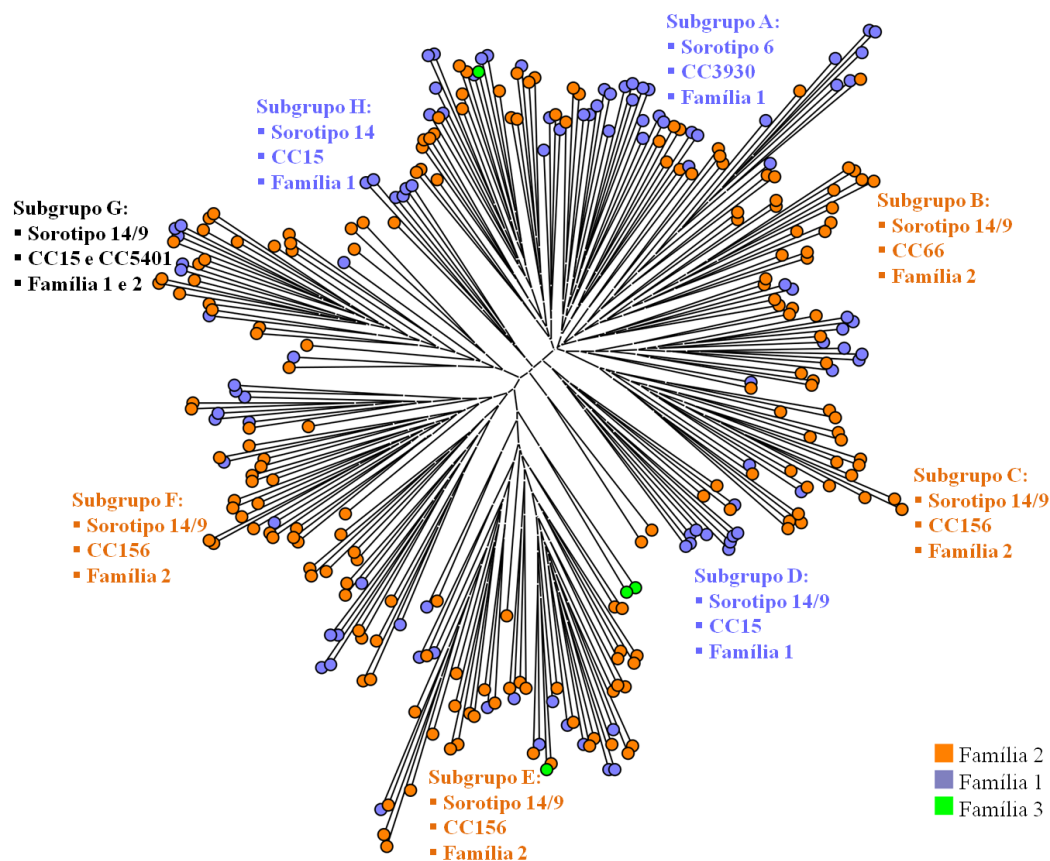


Figura 10-Diagrama gerado pelo método de correlação de Pearson e o algoritmo de *Neighbor Joining* demonstrando o agrupamento de 272 amostras de *Streptococcus pneumoniae* de acordo com os seus respectivos espectros gerados pela metodologia de MALDI-TOF MS.

Os principais subgrupos e suas características estão indicados na figura.

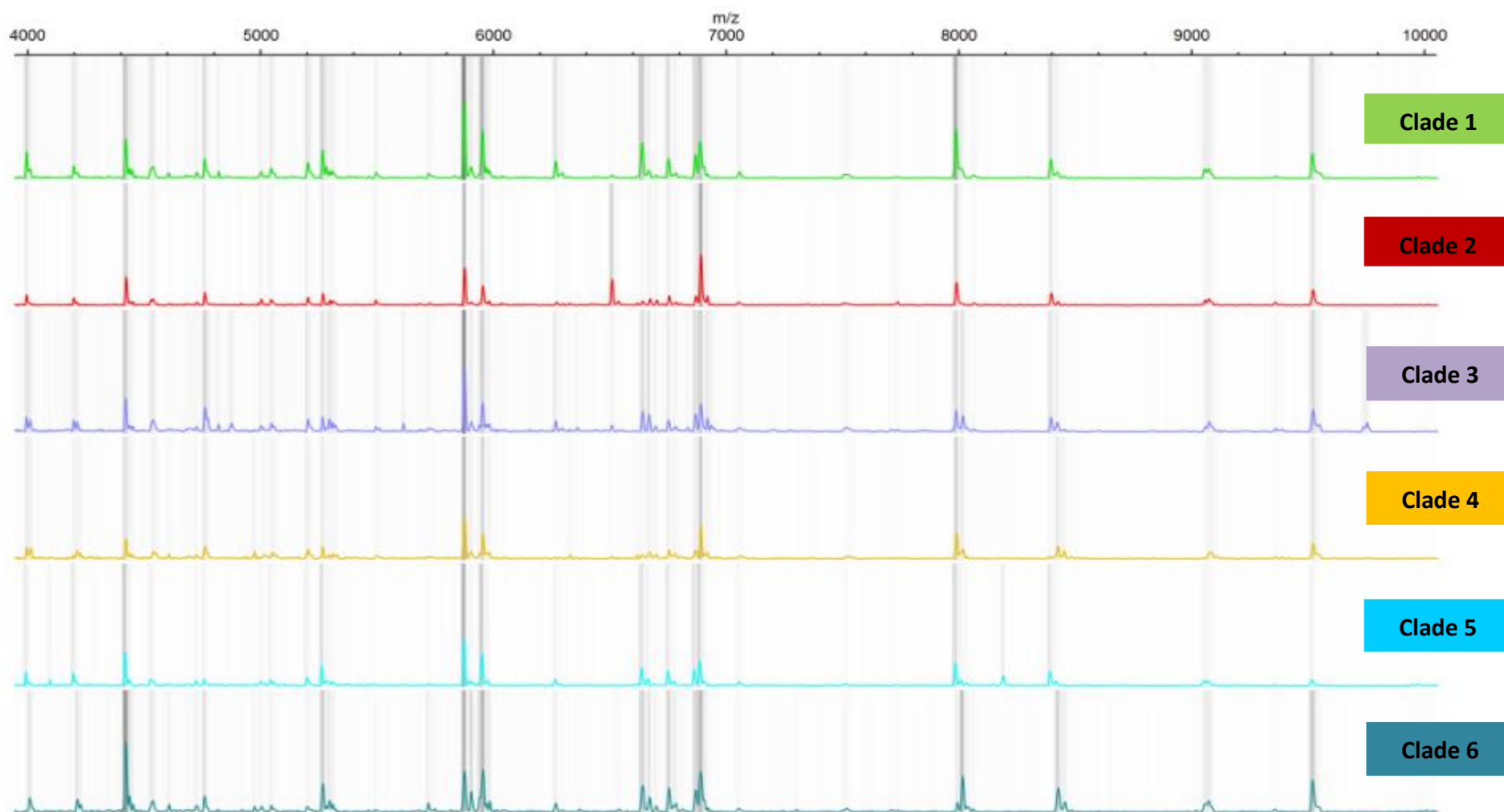


Figura 11-Espectros representativos das seis diferentes *clades* de *pspA* gerados pela metodologia de MALDI-TOF MS no presente estudo

Tabela 4-Perfil de presença (X) ou ausência (0) de biomarcadores detectados pela técnica de MALDI-TOF MS utilizados para a diferenciação das seis *clades* de genes *pspA* no presente estudo

<i>Clade</i>	Biomarcador^a								
	4422.16	5876.57	5955.31	6640.34	6752.92	6869.43	6890.75	7986.91	9519.82
<i>Clade 1</i>	X	X	X	X	0	0	X	X	X
<i>Clade 2</i>	X	X	0	0	0	0	X	0	0
<i>Clade 3</i>	0	X	X	0	0	0	X	0	0
<i>Clade 4</i>	0	X	X	0	0	0	X	X	0
<i>Clade 5</i>	0	X	0	0	0	0	0	X	0
<i>Clade 6</i>	X	X	X	X	X	X	0	0	X

^aOs biomarcadores representam posições massa/carga (m/z) ou picos específicos nos espectros analisados.

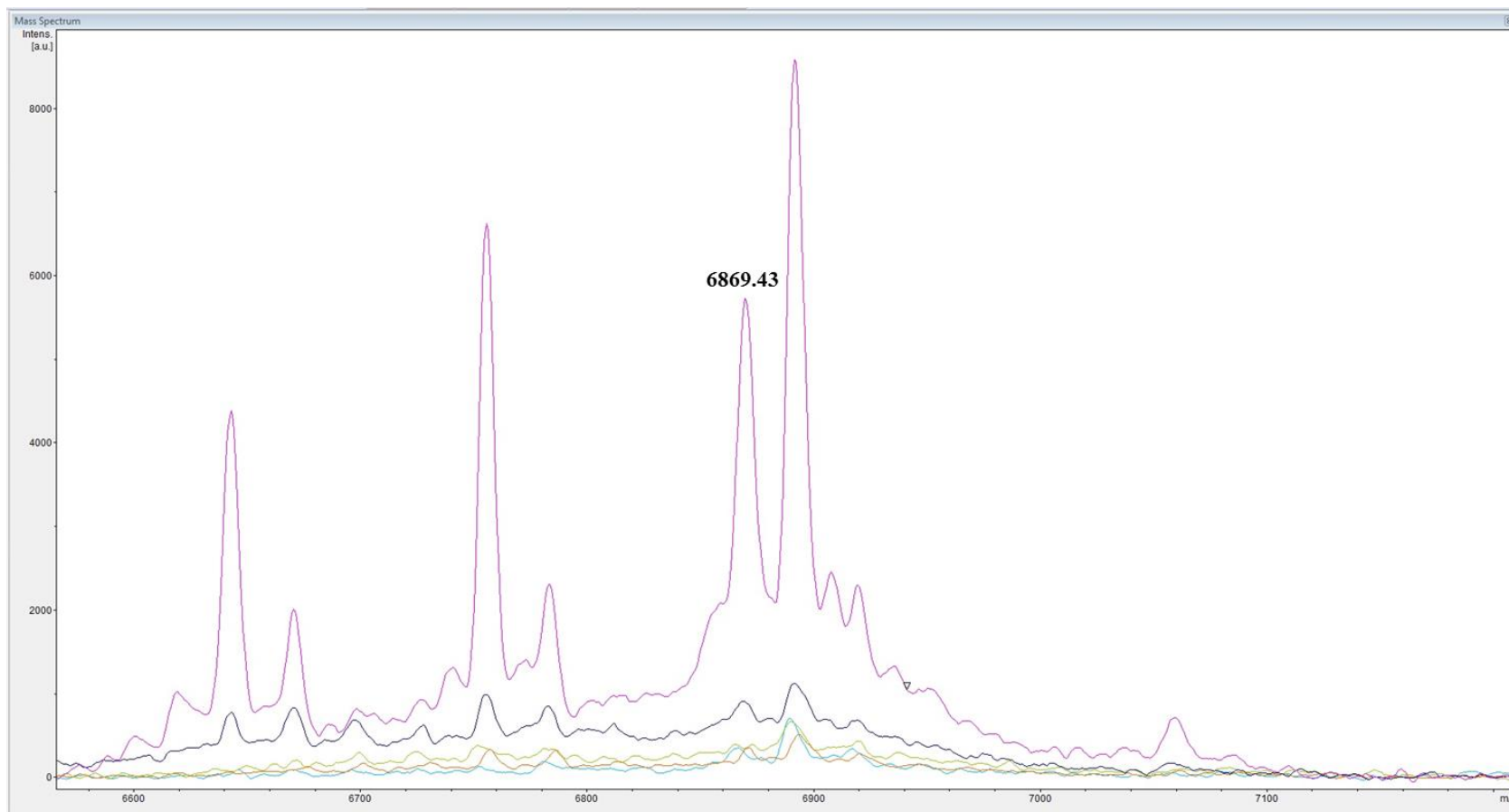


Figura 12-Trecho entre as posições 6600 e 7100 m/z dos espectros obtidos por MALDI-TOF MS de amostras de *Streptococcus pneumoniae* pertencentes à *clade* 6 (cor lilás) e às *clades* 1, *clade* 2, *clade* 3, *clade* 4 e *clade* 5 (demais cores na figura), demonstrando a presença ou ausência de um dos biomarcadores propostos pelo presente estudo (6869.43 m/z).

Tabela 5-Proteínas preditivas representantes dos biomarcadores utilizados para a diferenciação das seis *clades* de *pspA* identificadas através da pesquisa no banco de dados de proteínas de *Streptococcus pneumoniae* disponível em <http://biocyc.org/> (*BioCyc Database Collection*).

Biomarcador	Proteína preditiva	Massa molecular (em Da)*
4422.16	Proteína hipotética sem função descrita	4414
5876.57	Proteína hipotética sem função descrita	5853
5955.31	Fator de elongação	5892
6640.34	Glicosil transferase	6636
6752.92	Proteína hipotética sem função descrita	6770
6869.43	Transposase	6853
6890.75	Proteína hipotética sem função descrita	6871
7986.91	Proteína ribossomal L29	7987
9519.82	Proteína hipotética sem função descrita	9468

*Massa molecular registrada no banco de dados pesquisado. Da, Daltons. Foram considerados os peptídeos com valores de massa molecular mais aproximados ao equivalente das posições *m/z*.

DISCUSSÃO

Streptococcus pneumoniae é um importante patógeno causador de infecções graves e de frequência bastante elevada no mundo (HENRIQUES-NORMARK & TUOMANEN, 2013). O aumento significativo de amostras resistentes a antimicrobianos nos últimos anos reforça a necessidade de estudos epidemiológicos que incluam a determinação das características fenotípicas e genotípicas desse microrganismo, no intuito de adicionar informações sobre possíveis estratégias de profilaxia e controle das doenças pneumocócicas.

Neste sentido, a investigação de fatores de virulência é de extrema importância, principalmente de proteínas de superfície associadas à virulência, para ajudar na avaliação de possíveis alvos de abordagens vacinais futuras, tendo em vista que as formulações vacinais disponíveis no mercado atualmente apresentam uma cobertura incompleta das amostras de pneumococos, e, portanto, tendem a gerar a substituição de sorotipos prevalentemente circulantes por outros menos comuns (RICHTER *et al.*, 2009). Além disso, as estratégias vacinais baseadas na cápsula polissacarídica não incluem as amostras NT, que provavelmente não apresentam esta estrutura.

Neste cenário, a PspA tem ganhado destaque de diversos estudos, uma vez que estima-se que mais de 94% das amostras de *S. pneumoniae* circulantes no mundo apresentem essa proteína (CRONEY *et al.*, 2012). No presente estudo, genes *pspA* foram detectados em todas as 413 amostras de pneumococos analisadas, reforçando sua ampla distribuição nesta espécie no Brasil. Entre elas, 116 amostras (28,1% do total) pertenciam a sorotipos não incluídos na vacina 10-valente e 7 amostras (1,7% do total) eram NT, sugerindo que, apesar de escaparem à estratégia vacinal atualmente oferecida como parte do Calendário Brasileiro de Imunizações, essas amostras poderiam ser cobertas por uma abordagem profilática baseada em PspA.

Apesar do potencial como um promissor antígeno vacinal, a variabilidade genética dos genes *pspA* entre as amostras de pneumococos tem sido um grande empecilho, principalmente por haver certa divergência de prevalência de determinadas famílias e *clades* entre diferentes regiões geográficas. Enquanto a família 1 é prevalente na Argentina, Austrália, Reino Unido e Finlândia (MOLLERACH *et al.*, 2004; HOLLINGSHEAD *et al.*, 2006; ITO *et al.*, 2007; MELIN *et al.*, 2008), a família 2 é predominantemente encontrada na China, EUA, Espanha, França, Malásia, Polônia, Suécia e Japão (HOLLINGSHEAD *et al.*, 2006; SADOWY *et al.*, 2006; ROLO *et al.*,

2009; QIAN *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2012; YATIM *et al.*, 2012; HOTOMI *et al.*, 2013). No presente estudo, um número maior de amostras portadoras de genes pertencentes à família 2 foi observado, corroborando os resultados dos poucos estudos existentes na literatura conduzidos no Brasil, e que descrevem esta família como a mais comum (BRANDILEONE *et al.*, 2004; PIMENTA *et al.*, 2006; DE PINA, 2013).

Além disso, a *clade* 3 se destacou entre as amostras da família 2 enquanto a *clade* 1 se destacou entre aquelas pertencentes à família 1. Na literatura encontra-se uma distribuição similar, tanto a partir de amostras de colonização quanto de DPI em crianças e adultos de diferentes locais do mundo (PIMENTA *et al.*, 2006; ROLO *et al.*, 2009; QIAN *et al.*, 2011; YATIM *et al.*, 2012; HOTOMI *et al.*, 2013), indicando que a inclusão de tais *clades* em uma abordagem vacinal futura seria a estratégia ideal para alcançar o maior número de amostras circulantes em diversas regiões geográficas, incluindo o Brasil. Ainda, como é possível certa reação cruzada entre as diferentes *clades* de uma mesma família mas não entre *clades* de famílias diferentes (CRONEY *et al.*, 2012; KOTHARI *et al.*, 2015), a inclusão de fragmentos das famílias 1 e 2 em uma vacina baseada em PspA garantiria a cobertura de mais de 98% (407 amostras) das amostras incluídas no presente estudo, entre as quais estariam todas as 116 amostras pertencentes a sorotipos não vacinais.

Assim como observado anteriormente (BEALL *et al.*, 2000; MELIN *et al.*, 2008; ROLO *et al.*, 2009; QIAN *et al.*, 2011; DE PINA, 2013), a distribuição das famílias e *clades* entre as amostras analisadas no presente estudo foi dependente, em grande parte, do complexo clonal, não sendo associada a nenhuma outra característica da amostra, como sorotipo, origem clínica ou susceptibilidade à penicilina.

Os complexos CC156, CC15, CC66, CC3930 e CC5401 destacam-se pela maior prevalência, entre os clones incluídos no presente estudo (Figuras 6 e 7). Enquanto os quatro primeiros são importantes em nível mundial, o último apresenta circulação aparentemente restrita ao Brasil (<http://pubmlst.org/spneumoniae/>). Os CC15 e CC156 figuram entre os mais importantes causadores de DPI no mundo, sendo associados com clones descritos pelo PMEN relacionados à resistência antimicrobiana (England¹⁴-9 e Spain^{9V}-3 respectivamente) (BEALL *et al.*, 2000; BRANDILEONE *et al.*, 2004; SADOWY *et al.*, 2006). O CC66, por sua vez, apresenta uma ampla distribuição em diversas regiões do mundo estando associado com casos de infecção invasiva (ROLO *et al.*, 2009;) e com o clone PMEN Tenesse¹⁴-18.

A associação do CC15 e CC156 com os genes das famílias 1 e 2, respectivamente, já foi observada na Finlândia (MELIN *et al.*, 2008). Na Espanha (ROLO *et al.*, 2009), a associação entre CC15 e *clade* 1, assim como CC156 e CC66 com *clade* 3, também foi detectada. Igualmente, estudos com amostras isoladas na Polônia (SADOWY *et al.*, 2010), revelaram que a grande maioria das amostras representantes do ST156 possuía genes *pspA* da família 2 e *clade* 3. Esses dados, em conjunto com os resultados do presente estudo, demonstram que o tipo de genes *pspA* é altamente conservado dentro de cada complexo clonal entre as amostras de pneumococos.

A associação dos CC5401 e CC3930 com a família 1 e a *clade* 1 é relatado, pela primeira vez, no presente estudo. O CC3930 já foi encontrado circulando no Brasil, na Alemanha, na África do Sul, na Polônia e em Portugal, estando associado com amostras pertencentes ao sorogrupo 6 isoladas de casos de colonização e de DPI (VAN DER LINDEN *et al.*, 2013; <http://pubmlst.org/spneumoniae/>). Já o CC5401 representa um clone associado com o sorotipo 14 e amostras obtidas de casos de doenças pneumocócicas no Brasil.

Ao longo dos anos incluídos no estudo (1988-2014), observou-se uma tendência de aumento da prevalência de genes *pspA* da família 2 acompanhada de uma diminuição daqueles da família 1. No entanto entre os anos 2008 e 2011, foi observado um aumento considerável de amostras pertencentes à família 1, sendo esse fato associado com as amostras isoladas entre esses anos, que foram associados com o CC3930. A mudança de prevalência de família 1 para família 2 também foi observada nos EUA no período entre 2002 e 2010 (CRONEY *et al.*, 2012), o qual representava a era pós-PCV-7 neste país, e provavelmente estava associada ao espalhamento de clones específicos de pneumococos. No Brasil, durante o período de tempo analisado no presente estudo, a tendência de aumento da família 2 em relação à família 1 pode estar associada com a emergência do ST156, um genótipo associado com o sorotipo 14 e a não susceptibilidade à penicilina cuja circulação é prevalente em nosso meio desde meados da década de 1990. Uma vez que este estudo contemplou apenas um pequeno conjunto de amostras representantes da era pós-PCV-10 em nosso país, permanece a dúvida se esta tendência se manterá após a vacinação antipneumocócica em massa.

Genes *pspA* da família 3 e *clade* 6 são ainda considerados raros, sendo esporadicamente detectados em outros estudos com índices de ocorrência menores que 4% (HOLLINGSHEAD *et al.*, 2000; YATIM *et al.*, 2012; CRONEY *et al.*, 2012).

Neste estudo, 6 amostras (1,4%) foram detentoras de genes *pspA* desta família, todas apresentando características peculiares ou atípicas, tais como ausência de expressão de cápsula (todas consideradas NT ao gerar resultados negativos com todos os antissoros testados na reação de Quellung) e resistência à optoquina (2 amostras). Além disso, quatro amostras pertenciam ao ST7022 e duas ao ST7029, que são clones associados a amostras NT e ainda aparentemente restritos ao Brasil (<http://pubmlst.org/spneumoniae/>), sendo este último (ST7029) também associado a não susceptibilidade à penicilina. A associação entre amostras não encapsuladas coletadas de portadores assintomáticos e genes *pspA* da família 3 vem sendo observada também em outros locais, como Finlândia, EUA e Malásia (MELIN *et al.*, 2008; CRONEY *et al.*, 2012; YATIM *et al.*, 2012). Essas amostras vêm sendo detectadas com maior frequência nos últimos 7 anos, sugerindo que, sob a pressão seletiva do uso das vacinas pneumocócicas, amostras NT carreadoras de genes *pspA* da família 3 podem emergir em prevalência.

A literatura preconiza que amostras pertencentes a uma mesma *clade* compartilham pelo menos 80% de similaridade genética nas sequências de suas regiões CDR (HOLLINGSHEAD *et al.*, 2000), sendo este o critério atualmente utilizado para a determinação das *clades* entre amostras de pneumococos. Igualmente, no presente estudo, o corte de 80% de identidade nucleotídica foi considerado o ideal para determinar se as amostras pertenciam ou não a uma mesma *clade* (Tabela 3).

É descrito que a identidade média entre *clades* de uma mesma família gire em torno de 72% enquanto que a similaridade entre aquelas pertencentes a famílias diferentes seja menor que 50% (HOLLINGSHEAD *et al.*, 2000). Neste estudo, como esperado, foi observado que as diferentes *clades* pertencentes a uma mesma família apresentavam maior similaridade genética entre si (77% na família 1 e 28-63% na família 2) quando comparadas a *clades* de famílias diferentes (22-45%) (Tabela 3). Da mesma forma, as *clades* pertencentes a uma mesma família apresentaram-se mais próximas entre si na árvore filogenética (Figura 2). Curiosamente, a *clade* 5, considerada a mais homogênea internamente (com as amostras pertencentes a esta *clade* compartilhando 96% de similaridade entre si), foi a única que não se enquadrou nesses critérios, apresentando somente 28% de similaridade com as *clades* pertencentes a mesma família (*clades* 3 e 4) e um índice similar de identidade (22-30%) com as *clades* pertencentes a outras famílias. O maior distanciamento da *clade* 5 também foi verificado na árvore filogenética (Figura 2).

Baixos índices de identidade nucleotídica e similaridade genética podem indicar diferentes origens e genes ancestrais para as diferentes *clades*, o que pode ter contribuído para a diversidade atualmente observada nos genes *pspA*. O nível de polimorfismo observado nesses genes é maior do que o identificado em outros genes caracteristicamente polimórficos de *S. pneumoniae*, tais como os genes codificadores de proteínas ligadoras de penicilina (*pbp*) (LAIBLE, SPRATT, & HAKENBECK, 1991), e apresenta-se tão alto quanto os índices de polimorfismo geralmente detectados entre genes ortólogos de diferentes espécies bacterianas (HOLLINGSHEAD *et al.*, 2000).

Essa alta diversidade é provavelmente resultante de eventos de recombinação homóloga, os quais podem ocorrer com frequência entre 1 e 35% e podem envolver um ou múltiplos domínios da proteína (HOLLINGSHEAD *et al.*, 2000; PANDYA *et al.*, 2011). Neste estudo, a frequência de recombinação nos genes *pspA* das amostras analisadas variou de 6,5% a 38,7%, e incluiu tanto o domínio correspondente à CDR quanto o domínio rico em prolina, com destaque para este último.

Essas duas regiões foram escolhidas para análise no presente estudo porque são os alvos mais frequentemente avaliados para elaboração de novas vacinas baseadas em PspA (FELDMAN & ANDERSON, 2014). Por este motivo, a observação de taxas significativas de recombinação nessas regiões gera preocupações uma vez que pode sugerir uma maneira através da qual os pneumococos seriam potencialmente capazes de escapar às vacinas baseadas em PspA. Os pneumococos são comumente carregados na nasofaringe, e frequentemente há mais de uma amostra colonizando este nicho simultaneamente (HENRIQUES-NORMARK & TUOMANEN, 2013). Além disso, *S. pneumoniae* é conhecido pela sua capacidade de facilmente adquirir DNA do ambiente e incorporá-lo em seu genoma. De fato, os recombinantes detectados no presente estudo representaram diferentes sorotipos e STs, e haviam sido isolados tanto de colonização quanto de casos de infecção (incluindo infecções invasivas), demonstrando que a recombinação ocorre extensivamente nesses genes, independentemente de qualquer outra característica da amostra.

Uma amostra de *S. mitis* incluída no presente estudo também apresentou genes *pspA*, demonstrando que esta proteína não é exclusiva aos pneumococos e que outros membros do grupo mitis, que são considerados comensais e raramente causam doença (ENGEL *et al.*, 2014), podem apresentar potencial de virulência similar ao dos pneumococos. Estudos anteriores já relataram a presença de genes similares em amostras pertencentes a espécies relacionadas (DENAPATE *et al.* 2010; DONATI *et*

al 2010; MADHOUR *et al.* 2011), tais como *S. oralis*, e esse fato apresenta importantes implicações na utilização desse alvo como marcador da espécie *S. pneumoniae*, bem como no desenvolvimento de novas vacinas baseadas nessa proteína.

Com o sequenciamento do genoma completo de uma amostra de referência de *S. mitis* (amostra B6), foi revelado um grande número de genes codificadores de proteínas ligadoras de colina, e muitas delas, quando comparadas a proteínas semelhantes em *S. pneumoniae*, apresentam as principais diferenças no domínio de ligação à colina (C-terminal), principalmente em relação ao número e extensão das unidades de repetição características deste domínio (DENAPAITÉ *et al.*, 2010). Neste estudo, uma baixa identidade nucleotídica (26-29%) foi observada também entre a CDR do gene *pspA* detectado na amostra de *S. mitis* e as dos genes *pspA* das amostras de pneumococos (Tabela 3), o que sugere diferentes origens para os genes das duas espécies. No entanto, a observação de que o índice de similaridade entre *S. mitis* e *S. pneumoniae* (26-29%) foi similar ao observado entre a *clade* 5 e as outras *clades* de pneumococos (22-30%) corrobora a hipótese de que o gene detectado na amostra de *S. mitis* seja realmente um gene *pspA*. Curiosamente, tanto em relação à identidade nucleotídica (Tabela 3) quanto em relação ao distanciamento evolutivo (Figura 2), a amostra de *S. mitis* apresentou-se mais próxima da *clade* 5.

Devido ao compartilhamento dos mesmos nichos e ao alto relacionamento genético (ENGÉN *et al.*, 2014), eventos de recombinação em genes associados à virulência entre *S. pneumoniae* e outros membros do grupo *mitis* podem ocorrer e já foram relatados para os genes codificadores de neuraminidase A e de IgA protease (POULSEN *et al.*, 1998; KING, WHATMORE & DOWSON, 2005). No presente estudo, foram detectados sinais de recombinação na amostra de *S. mitis* detentora de genes *pspA* nas regiões correspondentes à CDR e à região rica em prolina (Figura 9). A observação de que esses mesmos sinais foram detectados também entre amostras de pneumococos, e que os genes das duas espécies compartilham homologia suficiente para permitir a recombinação, sugere a possibilidade de transferência horizontal interespecie de fragmentos de *pspA*.

A técnica de MALDI-TOF MS vem sendo considerada uma técnica promissora na identificação rápida de espécies bacterianas clinicamente importantes, baseada na detecção de biomarcadores altamente conservados intraespécie, tais como as proteínas ribossomais (FRIEDERICHS *et al.*, 2007; IKRYANNIKOVA *et al.*, 2013; DUBOIS *et al.*, 2013). No entanto, ela apresenta limitações na identificação e discriminação de

amostras de *S. pneumoniae* e outras espécies do grupo mitis pelo fato destas espécies serem intimamente relacionadas e geralmente indistinguíveis utilizando-se apenas os marcadores ribossomais (ENGLEN *et al.*, 2014).

No entanto, a sua utilização para discriminar entre amostras de uma mesma espécie, ou seja, detectar diferentes variantes de *S. pneumoniae* já foi proposta (WILLIAMSON *et al.*, 2008) e é corroborada pelas observações geradas no presente estudo. Através da metodologia de MALDI-TOF MS foi possível distribuir as amostras de *S. pneumoniae* em diferentes subgrupos, os quais de forma geral correlacionaram-se com a família de genes *pspA* e com os respectivos complexos clonais (Figura 10). Além disso, foi possível selecionar nove biomarcadores de interesse para a diferenciação das seis diferentes *clades* de genes *pspA* (Tabela 4), os quais representaram, além de proteínas hipotéticas sem função definida ainda, proteínas constitutivas do microrganismo, incluindo uma proteína ribossomal (Tabela 5), o que reforça a observação de que essas proteínas estão entre os principais alvos detectados pela técnica.

Apesar de ainda necessitar de uma avaliação mais extensa e robusta, os resultados sugerem que a técnica de MALDI-TOF MS apresenta potencial para ser utilizada na diferenciação das *clades* de *pspA*. Tal proposta seria uma alternativa ao sequenciamento da região CDR, que é a metodologia padrão utilizada atualmente para a determinação das *clades*, sendo para este propósito mais fácil, rápida e com menor custo de execução.

CONCLUSÕES

Genes *pspA* foram detectados em todas as amostras de *S. pneumoniae* analisadas neste estudo, demonstrando sua ampla distribuição nessa espécie e sua potencial utilidade como futuro alvo profilático.

Genes *pspA* da família 2 foram os predominantes, seguidos pelos genes da família 1. Apesar de raros, genes *pspA* da família 3 foram detectados em seis amostras de *S. pneumoniae* analisadas.

Amostras pertencentes a uma mesma *clade* compartilharam de 81 a 96% de identidade nucleotídica nas regiões CDR de seus genes *pspA*, enquanto que amostras pertencentes a *clades* diferentes apresentaram de 22 a 77% de similaridade, corroborando o índice previamente estabelecido de identidade intra*clade* de $\geq 80\%$ e evidenciando a diversidade genética observada nos genes *pspA*.

Clades pertencentes a uma mesma família apresentaram-se mais próximas entre si do ponto de vista evolutivo do que aquelas pertencentes a famílias diferentes, indicando que os genes *pspA* representantes das diferentes famílias podem ter diferentes origens evolutivas.

A distribuição das famílias e *clades* foi mais associada aos complexos clonais do que de outras características das amostras (origem clínica, sorotipo ou perfil de susceptibilidade à penicilina), sugerindo uma tendência à conservação dos tipos de *pspA* em amostras pertencentes a um mesmo clone.

Uma amostra de *S. mitis* albergava gene *pspA*, o qual apresentou uma baixa identidade nucleotídica na região CDR com os genes *pspA* de *S. pneumoniae*, demonstrando que essa proteína não é exclusiva de *S. pneumoniae* e que provavelmente esses genes apresentam diferentes origens ancestrais nas duas espécies.

Eventos de recombinação foram observados tanto na CDR como na região rica em prolina dos genes *pspA*, demonstrando que a recombinação ocorre extensivamente nesses genes. Além disso, eventos de recombinação foram compartilhados entre *S. mitis* e *S. pneumoniae*, evidenciando a provável ocorrência de transferência horizontal de genes entre essas duas espécies.

A metodologia de MALDI-TOF MS apresentou-se como uma potencial alternativa ao sequenciamento para a determinação das *clades* de genes *pspA*, embora ainda seja necessária uma avaliação mais extensa e robusta.

O presente estudo adiciona importantes dados relativos à distribuição das famílias e *clades* de genes *pspA* entre amostras de pneumococos que representam não somente a população predominante mundialmente e em nossa região, como também suas minorias e atípias, garantindo assim um levantamento e rastreamento epidemiológico mais completo e acurado para a especulação de possíveis alvos profiláticos. Além disso, esses dados indicam que uma proposta profilática incluindo fragmentos das proteínas PspA das famílias 1 e 2 aumentaria o nível de proteção contra as amostras de *S. pneumoniae* incluídas neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, A.L.; OLIVEIRA, R.; VIEIRA, M.A.; MINAMISAVA, R.; PESSOA, V. JR.; BRANDILEONE, M.C.; ALVES, S.L.; ALFIERI, F.; PAGLIARINI, R.; MORAES, J.C.; GRAY, S. & RODGERS, G.L. **Population based surveillance for invasive pneumococcal disease and pneumonia in infants and young children in Goiânia, Brazil.** Vaccine. 30, 1901-1909, 2012.
- AUSTRIAN, R. **Pneumococcus: The first one hundred years.** Rev. Infect. Dis. 3, 183-189, 1981.
- BARROSO, D.E.; GODOY, D.; CASTIÑEIRAS, T.M.; TULENKO, M.M.; REBELO, M.C. & HARRISON, L.H. **β -Lactam resistance, serotype distribution, and genotypes of meningitis-causing *Streptococcus pneumoniae*, Rio de Janeiro, Brazil.** Pediatr. Infect. Dis. J. 31, 30-36, 2012.
- BEALL, B.; GHERARDI, G.; FACKLAM, R.R. & HOLLINGSHEAD, S.K. **Pneumococcal *pspA* sequence types of prevalent multiresistant pneumococcal strains in the United States and of internationally disseminated clones.** J Clin Microbiol. 38, 3663-3669, 2000.
- BOGAERT, D.; HERMANS, P.W.M.; ADRIAN, P.V.; RUMKE, H.C. & DE GROOT, R. **Pneumococcal vaccines: an update on current strategies.** Vaccine. 22, 2209- 2220, 2004a.
- BOGAERT, D.; de GROOT, R. & HERMANS, P.W.M. ***Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease.** Lancet. Infect. Dis. 4: 144 – 154, 2004b.
- BOULNOIS, G.J. **Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*.** J. Clin. Microbiol. 138, 249-259, 1992.
- BRANDILEONE, M.C.C.; ANDRADE, A.L.S.S.; DI FABIO, J.L.; GUERRA, M.L.L.S. & AUSTRIAN, R. **Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: Potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis.** J. Infect. Dis. 187, 1206-1212, 2003.
- BRANDILEONE, M.C.C.; ANDRADE, A.L.S.S.; TELES, E.M.; ZANELLA, R.C.; YARA, T.I. & DI FABIO, J.L. **Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines.** Vaccine. 22, 3890-3896, 2004.
- BRANDILEONE, M.C.C.; CASAGRANDE, S.T.; GUERRA, M.L.S.; ZANELLA, R.C.; ANDRADE, A.L.S.S. & DI FABIO, J.L. **Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage.** J. Med. Microbiol. 55, 567-574, 2006.
- BRICKS, L.F. & BEREZIN, E. **Impact of pneumococcal conjugate vaccine on the prevention of invasive pneumococcal diseases.** J. Pediatr. 82, 67-74, 2006.
- BRILES, D.E.; HOLINGSHEAD, S.K.; PATON, J.C.; ADES, E.W.; NOVAK, L.; VAN GINKEL, F.W. & BENJAMIN, W.H. Jr. **Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*.** J. Infect. Dis. 188, 339-348, 2003.
- BUTLER, J.C.; DOWELL, S.F. & BREIMAN, R.F. **Epidemiology of emerging pneumococcal drug resistance: implications for treatment and prevention.** Vaccine. 16, 1693-1697, 1998.
- CAMARGO, D.R.; PAIS, F.S.; VOLPINI, Â.C.; OLIVEIRA, M.A. & COIMBRA, R.S. **Revisiting molecular serotyping of *Streptococcus pneumoniae*.** BMC Genomics. 16, 2015.
- CAMARGOS, P.; FISCHER, G.B.; MOCELIN, H.; DIAS, C. & RUVINSKY, R. **Penicillin resistance and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America.** Paediatr Respir Rev. 7, 209-214, 2006.
- CAMPOS, I.B.; DARRIEUX, M.; FERREIRA, D.M.; MIYAJI, E.N.; SILVA, D.A.; ARÊAS, A.P.; AIRES, K.A.; LEITE, L.C.; HO, P.L. & OLIVEIRA, M.L. **Nasal immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing the Pneumococcal Surface Protein A: induction of antibodies,**

complement deposition and partial protection against *Streptococcus pneumoniae* challenge. Microbes Infect. 10, 481-488, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Missed opportunities for pneumococcal and influenza vaccination of Medicare pneumonia inpatients--12 western states, 1995.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 46, 919-923, 1997.

CHARALAMBOUS, B.M. & LEUNG, M.H. **Pneumococcal sepsis and nasopharyngeal carriage.** Curr Opin Pulm Med. 18, 222-227, 2012.

CHERIAN, T.; LATITHA, M.K.; MANOHARAN, A.; THOMAS, K.; YOLKEN, H.R. & STEINHOFF, M.C. **PCR-Enzyme immunoassay for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in cerebrospinal fluid samples from patients with culture-negative meningitis.** J. Clin. Microbiol. 36, 3605-3608, 1998.

CHO, E.Y.; LEE, H.; CHOI, E.H.; KIM, Y.J.; EUN, B.W.; CHO, Y.K.; KIM, Y.K.; JO, D.S.; LEE, H.S.; LEE, J.; KIM, M.N.; KIM, D.S. & LEE, H.J. **Serotype distribution and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from invasive infections after optional use of the 7-valent conjugate vaccine in Korea, 2006-2010.** Diagn Microbiol Infect Dis. 78, 481-486, 2014.

COGNÉ, N.; CLAVERY, J.; DENIS, F. & MARTIN, C. **A novel mutation in the alpha-helix 1 of the C subunit of the F(1)/F(0) ATPase responsible for optochin resistance of a *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate.** Diagn Microbiol Infect Dis. 38, 119-121, 2000.

CORLESS, C.E.; GUIVER, M.; BORROW, R.; EDWARDS-JONES, V.; FOX, A.J. & KACZMARSKI, E.B. **Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR.** J. Clin. Microbiol. 39, 1553-1558, 2001.

COSTA, N.S. **Análise do polimorfismo numérico de sequências repetitivas em múltiplos loci (MLVA) como instrumentos de avaliação da diversidade genética de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 14.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2012.

COTTAGNOUD, P.; PFISTER, M.; ACOSTA, F.; COTTAGNOUD, M.; FLATZ, L.; KÜHN, F.; MÜLLER, H.P. & STUCKI, A. **Daptomycin is highly efficacious against penicillin-resistant and penicillin- and quinolone-resistant pneumococci in experimental meningitis.** Antimicrob. Agents Chemother. 48, 3928-3933, 2004.

CRONEY, C.M.; COATS, M.T.; NAHM, M.H.; BRILES, D.E. & CRAIN, M.J. **PspA family distribution, unlike capsular serotype, remains unaltered following introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine.** Clin Vaccine Immunol. 19, 891-896, 2012.

CRUM, N.F.; BARROZO, C.P.; CHAPMAN, F.A.; RYAN, M.A. & RUSSELL, K.L. **An outbreak of conjunctivitis due to a novel unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* among military trainees.** Clin. Infect. Dis. 39, 1148-1154, 2004.

DAGAN, R.; GIVON-LAVI, N.; ZAMIR, O. & FRASER, D. **Effect of a nonavalent conjugate vaccine on carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in day-care centers.** J. Pediatr. Infect Dis. 22, 532-539, 2003.

DE PINA, S. E. C. M. **Distribuição de genes *pspA* entre diferentes subpopulações de *Streptococcus pneumoniae* isoladas no Brasil.** Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

DENAPATE, D.; BRÜCKNER, R.; NUHN, M.; REICHMAN, P.; HENRICH, B.; MAURER, P.; SCHÄHLE, Y.; SELBMANN, P.; ZIMMERMANN, W.; WAMBUTT, R. & HAKENBECK, R. **The genome of *Streptococcus mitis* B6 - what is a commensal?** PLoS ONE 5, 9426, 2010.

DI FABIO, J.L.; CASTANEDA, E.; AGUDELO, C.I.; DE LA HOZ, F.; HORTAL, M.; CAMOU, T.; ECHANIZ-AVILEZ, G.; BARAJAS, M.N.C.; HEITMANN, I.; HORMAZABAL, J.C.; BRANDILEONE, M.C.; DIAS, V. V.S.; REGUEIRA, M.; RUVINSKI, R.; CORSO, A.; LOVGREN, M.; TALBO, T. J. A. & DE QUADROS, C. **Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and**

penicillin susceptibility in Latin America Sireva-Vígia Group, 1993 to 1999. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 20, 959-967, 2001.

DIAS, C.A.; AGNES, G.; FRAZZON, A.P.G.; KRUGER, F.D.; D'AZEVEDO, P.A. & CARVALHO, M.G.S.; FACKLAM, R.R. & TEIXEIRA, L.M. **Diversity of mutations in the *atpC* gene coding for the c subunit of F₀F₁ ATPase in clinical isolates of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from Brazil.** *J. Clin. Microbiol.* 45, 3065–3067, 2007a.

DIAS, C.A.; TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.; & BEALL, B. **Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children.** *J. Med. Microbiol.* 56, 1185–1188, 2007b.

DONATI, C.; HILLER, N. L.; TETTELIN, H.; MUZZI, A.; CROUCHER, N. J.; ANGIUOLI, S. V.; OGGIONI, M.; HOTOPP, J. C. D.; HU, F. Z.; RILEY, D. R.; COVACCI, A.; MITCHELL, T. J.; BENTLEY, S. D.; KILIAN, M.; EHRLICH, G. D.; RAPPUOLI, R.; MOXON, E. R. & MASIGNANI, V. **Structure and dynamics of the pan-genome of *Streptococcus pneumoniae* and closely related species.** *Genome Biology* 11, 107, 2010

DUARTE, C.; SANABRIA, O. & MORENO, J. **Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 invasive isolates in Colombia.** *Rev Panam Salud Publica.* 33, 422-426, 2013.

DUBOIS, D. SEGONDS, C.; PRERE, M.F.; MARTY, N. & OSWALD, E. **Identification of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates among other alpha and nonhemolytic streptococci by use of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system.** *J. Clin. Microbiol.*, 51, 1861-1867, 2013.

ENGEN, S.A.; VALEN, R. H.; BECATTINI, S.; JARROSSAY, D.; BLIX, I.J.; PETERSEN, F.C.; SALLUSTO, F. & SCHENCK, K. **The oral commensal *Streptococcus mitis* shows a mixed memory Th cell signature that is similar to and cross reactive with *Streptococcus pneumoniae*.** *PLoS One.* 13, 2014.

ENRIGHT, M.C. & SPRATT, B.G. **A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease.** *Microbiology.* 144, 3049-3060, 1998.

EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM. *EARSS Annual Report*, 2014.

FELDMAN, C. & ANDERSON, R. **Review: current and new generation pneumococcal vaccines.** *J Infect.* 69, 309-25, 2014.

FENOLL, A.; BOURGON, M.; MUÑOZ, R.; VICIOSO, D. & CASAL, J. **Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979-1989.** *Rev Infect Dis.* 13, 56-60, 1991.

FERREIRA, D.M.; MIYAJI, E.N.; OLIVEIRA, M.L.; DARRIEUX, M.; ARÊAS, A.P.; HO, P.L. & LEITE, L.C. **DNA vaccines expressing pneumococcal surface protein A (PspA) elicit protection levels comparable to recombinant protein.** *J Med Microbiol.* 55, 375-378, 2006.

FLETCHER, M.A. & FRITZELL, B. **Pneumococcal conjugate vaccines and otitis media: an appraisal of the clinical trials.** *Int J Otolaryngol.* 129-135, 2012.

FLETCHER, M.A.; SCHMITT, H.J.; SYROCHKINA, M. & SYLVESTER, G. **Pneumococcal empyema and complicated pneumonias: global trends in incidence, prevalence, and serotype epidemiology.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33, 879-910, 2014.

FREY, S. E. ; LOTTENBACH, K. R.; HILLB, H.; BLEVINS, T. P.; YUA, Y.; ZHANG, Y.; BRENNEMAN, K. E.; KELLY-AEHLED, S. M.; MCDONALD, C.; JANSEN, A. & CURTISS, R. **A Phase I, dose-escalation trial in adults of three recombinant attenuated *Salmonella Typhi* vaccine vectors producing *Streptococcus pneumoniae* surface protein antigen PspA.** *Vaccine* 31, 4874– 4880, 2013.

FRIEDERICH, C. RODLOFF, A.C.; CHHATWAL, G.S.; SCHELLENBERGER, W. & ESCHRICH, K. **Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination.** J. Clin. Microbiol., 45, 2392-2397, 2007.

GARCÍA, E.; GARCIA, J.L.; ARRARÁS, A.; SÂNCHEZ-PUELLES, J.M. & LÓPEZ, R. **Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophage.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 914 -918, 1988.

GARCÍA, E.; LLULL, D.; MUÑOZ, R.; MOLLERACH, M. & LÓPEZ, R. **Current trends in capsular polysaccharide biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae*.** Res. Microbiol. 151, 429-435, 2000.

GENSCHMER, K.R.; ACCAVITTI-LOPER, M.A. & BRILES, D.E. **A modified surface killing assay (MSKA) as a functional in vitro assay for identifying protective antibodies against pneumococcal surface protein A (PspA).** Vaccine, 32, 39-47, 2014.

GENO, K.A.; GILBERT, G.L.; SONG, J.Y.; SKOVSTED, I.C.; KLUGMAN, K.P.; JONES, C.; KONRADSEN, H.B. & NAHM, M.H. **Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future.** Clin Microbiol Rev. 28, 871-899, 2015.

GRANDO, I.M.; MORAES, C.D.; FLANNERY, B.; RAMALHO, W.M.; HORTA, M.A.; PINHO, D.L. & NASCIMENTO, G.L. **Impact of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis in children up to two years of age in Brazil.** Cad Saude Publica. 31,276-284, 2015.

GRAY, B.M. & DILLON, H.C. **Clinical and epidemiological studies of pneumococcal infection in children.** Pediatr Infect Dis J. 5, 201-217, 1986.

GOULD, C.V.; SNIEGOWSKI, P.D.; SHCHEPETOV, M.; METLAY, J.P. & WEISER, J.N. **Identifying mutator phenotypes among fluoroquinolone-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* using fluctuation analysis.** Antimicrob. Agents Chemother. 51, 3225-3229, 2007.

HAKENBECK, R.; MADHOUR, A.; DENAPAITE, D. & BRÜCKNER, R. **Versatility of choline metabolism and choline binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci.** FEMS Microbiol Rev 33, 572-586, 2009.

HANAGE, W.P.; KAIJALAINEN, T.H.; SYRJANEN, R.K.; AURANEN, K.; LEINONEN, M.; MAKELA, P.H. & SPRATT, B.G. **Invasiveness of serotypes and clones of *Streptococcus pneumoniae* among children in Finland.** Infect. Immun. 73, 431-435, 2005.

HANAGE, W.P.; FRASER C.; TANG J.; CONNOR, T.R. & CORANDER, J. **Hyper recombination, diversity, and antibiotic resistance in pneumococcus.** Science 324, 1454-1457, 2009.

HANSMANN, D. & BULLEN, M.M. **A resistant pneumococcus.** Lancet. 2, 264-265, 1967.

HAUGHNEY, S.L.; PETERSEN, L.K.; SCHOOF, A.D.; RAMER-TAIT, A.E.; KING, J.D.; BRILES, D.E.; WANNEMUEHLER, M.J. & NARASIMHAN, B. **Retention of structure, antigenicity, and biological function of pneumococcal surface protein A (PspA) released from polyanhydride nanoparticles.** Acta Biomaterialia 9, 8262-8271, 2013.

HENRICHSEN, J. **Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*.** J Clin Microbiol. 33, 2759-2760, 1995.

HENRIQUES-NORMARK, B & TUOMANEN, E.I. **The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis.** Cold Spring Harb Perspect Med. 3:a010215, 2013.

HIRST, R.A.; KADIOGLU, A.; O'CALLAGHAN, C & ANDREW, P. W. **The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis.** Clin. Exp. Immunol. 138, 195-201, 2004.

HOLLINGSHEAD, S.K.; BECKER, R. & BRILES, D.E.; **Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*.** Infect Immun. 68, 5889-5900, 2000.

HOLLINGSHEAD, S.K. & BRILES, D.E. ***Streptococcus pneumoniae*: new tools for an old pathogen.** Curr. Opin. Microbiol. 4, 71-77, 2001.

HOLLINGSHEAD, S.K.; BARIL, L.; FERRO, S.; KING, J.; COAN, P.; BRILES, D.E. & PNEUMOCOCCAL PROTEINS EPI STUDY GROUP. **Pneumococcal surface protein A (PspA) family distribution among clinical isolates from adults over 50 years of age collected in seven countries.** J Med Microbiol. 55, 215-221, 2006.

HOSHINO, K.; WATANABLE, H.; SUGITA, R.; ASOH, N.; NTABAGUZI, S.A.; WATANABLE, K. OISHI, K. & NAGATAKE, T. **High rate of transmission of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* between parents and children.** J. Clin. Microbiol. 40: 4357-4359, 2002.

HOTOMI, M.; TOGAWA, A.; KONO, M.; IKEDA, Y.; TAKEI, S.; HOLLINGSHEAD, S.K.; BRILES, D.E.; SUZUKI, K. & YAMANAKA, N. **PspA family distribution, antimicrobial resistance and serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolated from upper respiratory tract infections in Japan.** PLoS One. 8, 58124, 2013.

INTER-AGENCY GROUP FOR CHILD MORTALITY ESTIMATION (IGME). **Levels and trends in child mortality.** Report 2014

IKRYANNIKOVA, L. N. FILIMONOVA, A.V.; MALAKHOVA, M.V.; SAVINOVA, T.; FILIMONOVA, O.; ILINA, E.N.; DUBOVICKAYA, V.A.; SIDORENKO, S.V. & GOVORUN, V.M. **Discrimination between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* based on sorting of their MALDI mass spectra.** Clin. Microbiol. Infect., v. 19, p. 1066-1071, 2013.

ITO, Y.; OSAWA, M.; ISOZUMI, R.; KANSAI COMMUNITY ACQUIRED PNEUMOCOCCAL PNEUMONIA STUDY GROUP. **Pneumococcal surface protein A family types of *Streptococcus pneumoniae* from community-acquired pneumonia patients in Japan.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 26, 739-742, 2007.

JAUNEIKAITE E.; TOCHEVA, A.S.; JEFFERIES, J.M.; GLADSTONE, R.A.; FAUST, S.N.; CHRISTODOULIDES, M.; HIBBERD, M.L. & CLARKE, S.C. **Current methods for capsular typing of *Streptococcus pneumoniae*.** J Microbiol Methods, 113, 41-49, 2015.

JEDRZEJAS, .M.; LAMANI, E. & BECKER, R.S. **Characterization of selected strains of pneumococcal surface protein A.** J Biol Chem. 276, 33121-33128, 2001.

JEDRZEJAS, M.J. **Pneumococcal virulence factors: structure and function.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65, 187-207, 2001.

JEDRZEJAS, M.J. **Unveiling molecular mechanisms of bacterial surface proteins: *Streptococcus pneumoniae* as a model organism for structural studies.** Cell Mol Life Sci. 64, 2799-2822, 2007.

KADIOGLU, A.; WEISER, J.N.; PATON, J.C. & ANDREW, P.W. **The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease.** Nat Ver Microbiol. 6, 288-301, 2008.

KEGELE, F.C.O. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a antimicrobianos e pertencentes aos sorotipos 9N, 9V, 14, 19F, 23B e 23F isoladas no Brasil.** Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

KING, S.J.; WHATMORE, A.M. & DOWSON, C.G. **NanA, a neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae*, shows high levels of sequence diversity, at least in part through recombination with *Streptococcus oralis*.** J Bacteriol. 187, 5376-5386, 2005.

KOECK, J.L.; NJANPOP-LAFOURCADE .B.M.; CADE, S.; VARON, E.; SANGARE, L.; VALJEVAC S. VERGNAUD, G. & POURCEL, C. **Evaluation and selection of tandem repeat loci for *Streptococcus pneumoniae* MLVA strain typing.** BMC Microbiol. 5, 66, 2005.

KOTHARI, N.; KOTHARI, S.; CHOI, Y.J.; DEY, A.; BRILES, D.E.; RHEE, D.K. & CARBIS, R. **A bivalent conjugate vaccine containing PspA families 1 and 2 has the potential to protect against a wide range of *Streptococcus pneumoniae* strains and *Salmonella Typhi*.** Vaccine. 33, 783-788, 2015.

- KLUGMAN, K.P. & KOORNHOF, H.J. **Drug resistance patterns and serogroups or serotypes of pneumococcal isolates from cerebrospinal fluid or blood, 1979-1986.** J. Infect. Dis. 158, 956-964, 1988.
- LAIBLE, G.; SPRATT, B.G. & HAKENBECK, R. **Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*.** Mol Microbiol. 5, 1993-2002, 1991.
- LAVAL, C.B.; ANDRADE, A.L.S.S.; PIMENTA, F.C.; DE ANDRADE, J.G.; OLIVEIRA, R.M.; SILVA, A.S.; DE LIMA, E.C.; di FABIO, J.L.; CASAGRANDE, S.T. & BRANDILEONE, M.C.C. **Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the area of pneumococcal vaccines.** Clin.Microbiol. Infect. 12, 50-55, 2006.
- LI, Q.; CHENG, W.; MORLOT, C.; BAI, X.H.; JIANG, Y.L.; WANG, W.; ROPER, D.I.; VERNET, T.; DONG, Y.H.; CHEN, Y. & ZHOU, C.Z. **Full-length structure of the major autolysin LytA.** Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 71, 1373-1381, 2015.
- LIMA, F.A.; MIYAJI, E.N.; QUINTILIO, W.; RAW, I.; HO, P.L. & OLIVEIRA, M.L. **Pneumococcal Surface Protein A does not affect the immune responses to a combined diphtheria tetanus and pertussis vaccine in mice.** Vaccine. 7, 2465-2470, 2013.
- LIN, H.; PENG, Y.; LIN, Z.; ZHANG, S. & GUO, Y. **Development of a conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease based on capsular polysaccharides coupled with PspA/family 1 protein of *Streptococcus pneumoniae*.** Microb Pathog. 83, 35-40, 2015.
- LLULL, D.; LÓPEZ, R. & GARCÍA, E. **Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae*.** J. Clin.Microbiol. 44, 1250- 1256, 2006.
- LUND, E. & HENRICHSEN, J. **Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*.** Methods Microbiol. 12, 241-262, 1978.
- MADHOUR, A.; MAURER, P. & HAKENBECK, R. **Cell surface proteins in *S. pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*.** Iranian J Microbiol 3, 58-67, 2011.
- MANTESE, O.C.; PAULA, A.; ALMEIDA, V.V.; AGUIAR, P.A.; WOLKERS, P.C.; ALVARES, J.R.; ALMEIDA, S.C.; GUERRA, M.L. & BRANDILEONE, M.C. **Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of pneumococcus in children: analysis of 9 years.** J. Pediatr. 85, 495-502, 2009.
- MARRA, A.; LAWSON, S.; ASUNDI, J.S.; BRIGHAM, D. & HROMOCKYJ, A.E. **In vivo characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection.** Microbiology. 148, 1483-1491, 2002.
- McAVIN, J.C.; REILLY, P.A.; ROUDABUSH, R.M.; BARNES W.J.; SALMEN, A.; JACKSON, G.W.; BENINGA, K.K.; ASTORGA, A.; MCCLESKEY, F.K.; HUFF, W.B.; NIEMEYER, D. & LOHMAN, K.L. **Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR.** J. Clin. Microbiol. 39, 3446-3451, 2001.
- McDANIEL, L.S.; MCDANIEL, D.O.; HOLLINGSHEAD, S.K. & BRILES, D.E. **Comparison of the PspA sequence from *Streptococcus pneumoniae* EF5668 to the previously identified PspA sequence from strain Rx1 and ability of PspA from EF5668 to elicit protection against pneumococci of different capsular types.** Infect. Immun. 66, 4748 - 4754, 1998.
- McGEE, L.; MCDOUGAL, L.; ZHOU, J.; SPRATT, B.G.; TENOVER, F.C.; GEORGE, R.; HAKENBECK, R.; HRYNIEWICZ, W.; LEFÉVRE, J.C.; TOMASZ, A. & KLUGMAN, K.P. **Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network.** J. Clin. Microbiol. 39, 2565-2571, 2001.
- MELIN, M.M.; HOLLINGSHEAD, S.K.; BRILES, D.E.; HANAGE, W.P.; LAHDENKARI, M.; KAIJALAINEN, T.; KILPI, T.M. & KÄYHTY, H.M. **Distribution of pneumococcal surface protein A families 1 and 2 among *Streptococcus pneumoniae* isolates from children in finland who had acute otitis media or were nasopharyngeal carriers.** Clin Vaccine Immunol 15, 1555-1563, 2008.

- MELLROTH, P.; DANIELS, R.; EBERHARDT, A.; RÖNNLUND, D.; BLOM, H.; WIDENGREN, J.; NORMARK, S. & HENRIQUES-NORMARK, B. **LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan.** J Biol Chem. 287, 11018-11029, 2012.
- MELLROTH, P.; SANDALOVA, T.; KIKHNEY, A.; VILAPLANA, F.; HESEK, D.; LEE, M.; MOBASHERY, S.; NORMARK, S.; SVERGUN, D.; HENRIQUES-NORMARK, B. & ACHOUR, A. **Structural and functional insights into peptidoglycan access for the lytic amidase LytA of *Streptococcus pneumoniae*.** MBio.5, 2014.
- MENEZES, A.P.D.O.; CAMPOS, L.C.; DOS SANTOS, M.S.; AZEVEDO, J.; DOS SANTOS, R.C.; CARVALHO M.D.A.G.; BEALL, B.W.; MARTIN, S.W.; SALGADO, K.; REIS, M.G.; KO, A.I. & REIS, J.N. **Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000 - 2007.** Vaccine, 29, 1139-1144, 2010.
- MESSMER, T.O.; SAMPSON, J.S.; STINSON, A.; WONG, B.; CARLONE, G.M. & FACKLAM, R.R. **Comparison of four polymerase chain reaction assays for specificity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*.** Diagn Microbiol Infect Dis. 49, 249-254, 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Proposta para a introdução da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada) no calendário básico de vacinação da criança.** Brasília, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação.** Brasília, 2012.
- MITCHELL, A.M. & MITCHELL, T.J. ***Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation.** Clin Microbiol Infect. 16, 411-418, 2010.
- MITCHELL, T.J. & DALZIEL, C.E. **The biology of pneumolysin.** Subcell Biochem. 80, 145-160, 2014.
- MIYAJI, E.N.; OLIVEIRA, M.L.; CARVALHO, E. & HO, P.L. **Serotype-independent pneumococcal vaccines.** Cell Mol Life Sci.70, 3303-3326, 2013.
- MIYAJI, E.N.; VADESILHO, C.F.; OLIVEIRA, M.L.; ZELANIS, A.; BRILES, D.E. & HO, P.L. **Evaluation of a vaccine formulation against *Streptococcus pneumoniae* based on choline-binding proteins.** Clin Vaccine Immunol. 22, 213-220, 2015.
- MOISSENET, D.; VALCIN, M.; MARCHAND, V.; GARABÉDIAN, E.N.; GESLIN, P.; GARBARG-CHENON, A. & VU-THIEN, H. **Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibility to penicillin in a Paris children's hospital.** J Clin Microbiol. 35, 298-301, 1997.
- MOLLERACH, M.; REGUEIRA, M.; BONOFIOLIO, L.; CALLEJO, R.; PACE, J.; DI FABIO, J.L.; HOLLINGSHEAD, S.; BRILES, D. & *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* WORKING GROUP. **Invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentinian children: serotypes, families of pneumococcal surface protein A (PspA) and genetic diversity.** Epidemiol Infect. 132, 177-84, 2004.
- MOOK-KANAMORI, B.B.; GELDHOF, M.; VAN DER POLL, T., & VAN DE BEEK, D. **Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis.** Clin Microbiol Rev. 24, 557-591, 2011.
- MORRISON, K.E.; LAKE, D.; CROOK, J.; CARLONE, G.M.; ADES, E.; FACKLAM, R. & SAMPSON, J.S. **Confirmation of *psaA* in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and potential of this assay for identification and diagnosis.** J. Clin. Microbiol. 38, 434- 437, 2000.
- MOSSER, J.L. & TOMASZ, A. **Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity lysis by an autolytic enzyme.** J Biol Chem.245, 287-295, 1970.
- MOURA, C.A.B. **Avaliação da diversidade genética de *Streptococcus pneumoniae* dos sorotipos 9N, 9V e 14, empregando a eletroforese em campo pulsado (PFGE) e a análise do polimorfismo do gene *pspA* (tipificação *pspA*).** Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

MUSHER, D.M. **Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity and treatment.** Clin. Infect. Dis. 14, 801-809, 1992.

NEVES, F. P.; PINTO, T.C.; CORRÊA, M.A.; DOS ANJOS, B. R.; DE SOUZA, G. M. L.; RODRIGUES H.G.; CARDOSO, C.A.; BARROS, R.R. & TEIXEIRA, L.M. **Nasopharyngeal carriage, serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* among children from Brazil before the introduction of the 10-valent conjugate vaccine.** BMC Infect. Dis.13, 2013.

OBREGON, V.; GÁRCIA, P.; GÁRCIA, E.; FENOLL, A.; LÓPEZ, R. & GÁRCIA, J.L. **Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble.** J Clin Microbiol 40, 2545-2554, 2002.

OCHS, M.M.; BARTLETT, W.; BRILES, D.E.; HICKS, B.; JURKUVENAS, A.; LAU, P.; REN, B. & MILLAR, A. **Vaccine-induced human antibodies to PspA augment complement C3 deposition on *Streptococcus pneumoniae*.** Microbial Pathogens 44, 204–214, 2008.

OGUNNIYI, A.D.; GRABOWICZ, M.; BRILES, D.E.; COOK, J. & PATON, J.C. **Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*.** Infect Immun 75, 350 – 357, 2007.

OLARTE, L.; BARSON, W.J.; BARSON, R.M.; LIN, P.L.; ROMERO, J.R.; TAN, T.Q.; GIVNER, L.B.; BRADLEY, J.S.; HOFFMAN, J.A.; HULTÉN, K.G.; MASON, E.O. & KAPLAN, S.L. **Impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis in US children.** Clin Infect Dis. 13, 368, 2015.

OLIVEIRA, M.L.S.; MIYAJI, E.N.; FERREIRA, D.M.; MORENO, A.T.; FERREIRA, P.C.D.; LIMA, F.L.; SANTOS, F.L.; SAKAUCHI, M.A.; TAKATA, C.S.; HIGASHI, H.G.; RAW, I.; KUBRUSLY, F.S.; HO, P.L. **Combination of pneumococcal surface protein A (PspA) with whole cell Pertussis vaccine increases protection against pneumococcal challenge in mice.** Plos One 5, 2010.

PAI, R.; GERTZ, R.E. & BEALL, B. **Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates.** J Clin Microbiol 44, 124–131, 2006.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Informe Regional de Sireva II, 2010: datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*,** 2011.

PANDYA, G. A.; MCELLISTREM, M. C.; VENEPALLY, P.; HOLMES, M. H.; JARRAHI, B.; SANKA, R.; LIU, J.; KARAMYCHEVA, S. A.; BAI, Y.; FLEISCHMANN, R. D. & PETERSON, S. N. **Monitoring the long-term molecular epidemiology of the pneumococcus and detection of potential ‘vaccine escape’ strains.** plos one 6, 15950, 2011.

PASINATO, A.; INDOLFI, G.; MARCHISIO, P.; VALLERIANI, C.; CORTIMIGLIA, M.; SPANEVELLO, V.; CHIAMENTI, G.; BUZZETTI, R.; RESTI, M.; AZZARI, C. & ITALIAN GROUP FOR THE STUDY OF BACTERIAL NASOPHARYNGEAL CARRIAGE IN CHILDREN. **Pneumococcal serotype distribution in 1315 nasopharyngeal swabs from a highly vaccinated cohort of Italian children as detected by RT-PCR.** Vaccine.32, 1375-1381, 2014.

PATON, J.C. **Novel pneumococcal surface proteins: role in virulence and vaccine potential.** Trends Microbiol. 6, 85-87, 1998.

PAYNE, D.B.; SUN, A.; BUTLER, J.C.; SINGH, S.P.; HOLLINGSHEAD, S.K. & BRILES, D.E. **PspA family typing and PCR-based DNA fingerprinting with BOX A1R primer of pneumococci from the blood of patients in the USA with and without sickle cell disease.** Epidemiol Infect 133, 173-178, 2005.

PAYNE, D.B. & GRAY, B.M. ***Streptococcus pneumoniae* serogroup 6 clones over two decades.** Epidemiol Infect. 142, 2501-2513, 2014.

- PIKIS, A.; CAMPOS, J.M.; RODRIGUEZ, W.J. & KEITH, J.M. **Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanism, significance and clinical implications.** J Infect Dis 184, 582-590, 2001.
- PIMENTA, F.C.; RIBEIRO-DIAS, F.; BRANDILEONE, M.C.C.; MIYAJI, E.N.; LEITE, L.C.C. & ANDRADE, A.L.S.S. **Genetic diversity of PspA types among nasopharyngeal isolates collected during ongoing surveillance study of children in Brazil.** J Clin Microbiol. 44, 2838-2843, 2006.
- PINTO, T.C.; SOUZA, A.R.; DE PINA, S.E.; COSTA, N.S.; BORGES, N.A.A.; NEVES, F.P.; MERQUIOR, V.L.; DIAS, C.A.; PERALTA, J.M. & TEIXEIRA, L.M. **Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Brazil, with description of five novel mutations in the *atpC* gene.** J Clin Microbiol. 51, 3242-3259, 2013.
- PLETZ, M.W.; MAUS, U.; KRUG, N.; WELTE, T. & LODE, H. **Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species.** Int J Antimicrob Agents. 32, 199 - 206. 2008.
- POULSEN, K.; REINHOLDT, J.; JESPERGAARD, C.; BOYE, K.; BROWN, T.A.; HAUGE, M. & KILIAN, M. **A comprehensive genetic study of streptococcal immunoglobulin A1 proteases: evidence for recombination within and between species.** Infect Immun. 66, 181-190, 1998.
- QIAN, J.; YAO, K.; XUE, L.; XIE, G.; ZHENG, Y.; WANG, C.; SHANG, Y.; WANG, H.; WAN, L.; LIU, L.; LI, C.; JI, W.; WANG, Y.; XU, P.; YU, S.; TANG, Y.W.; YANG, Y. **Diversity of pneumococcal surface protein A (PspA) and relation to sequence typing in *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in Chinese children.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 31, 217-223, 2011.
- RAJAM, G.; ANDERTON, J.M.; CARLONE, G.M.; SAMPSON, J.S. & ADES, E.W. **Pneumococcal surface adhesin A (PsaA): a review.** Crit Rev Microbiol. 34, 163-173, 2008.
- RAYNER, R.E.; SAVILL, J.; HAFNER, L.M. & HUYGENS, F. **Genotyping *Streptococcus pneumoniae*.** Future Microbiol. 10, 653-664, 2015.
- RICHTER, S. S.; HEILMANN, K.P.; DOHRN, C.L.; RIAHI, F.; BEEKMANN, S.E. & DOERN, G.V. **Changing epidemiology of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 2004-2005.** Clin Infect Dis. 48, 23- 33, 2009.
- RICHTER, S.S.; HEILMANN, K.P.; DOHRN, C.L.; RIAHI, F.; DIEKEMA, D.J. & DOERN, G.V. **Pneumococcal serotypes before and after introduction of conjugate vaccines, United States, 1999-2011.** Emerg Infect Dis. 19, 1074-1083, 2013.
- RODGERS, G.L. & KLUGMAN, K.P. **The future of pneumococcal disease prevention.** Vaccine. 29, 43-48, 2011.
- ROLO, D.; ARDANUY, C.; FLEITES, A.; MARTÍN, R.; LIÑARES, J. **Diversity of pneumococcal surface protein A (PspA) among prevalent clones in Spain.** BMC Microbiol 9, 1471-2180, 2009.
- RUDAN, I.; BOSCHI-PINTO, C.; BILOGLAV, Z.; MULHOLLAND, K. & CAMPBELL, H. **Epidemiology and etiology of childhood pneumonia.** Bull World Health Organ., 86, 408-416, 2008.
- SADOWY, E.; SKOCZYŃSKA, A.; FIETT, J.; GNIADKOWSKI, M. & HRYNIEWICZ, W. **Multilocus sequence types, serotypes, and variants of the surface antigen PspA in *Streptococcus pneumoniae* isolates from meningitis patients in Poland.** Clin Vaccine Immunol. 13, 139-144, 2006.
- SADOWY, E.; KUCH, A.; GNIADKOWSKI, M. & HRYNIEWICZ, W. **Expansion and evolution of the *Streptococcus pneumoniae* Spain9V-ST156 clonal complex in Poland.** Antimicrob Agents Chemother. 54, 1720-1727, 2010.
- SATZKE, C.; TURNER, P.; VIROLAINEN-JULKUNEN, A.; ADRIAN, P. V.; ANTONIO, M.; HARE, K. M.; HENAO-RESTREPO, A. M.; LEACH, A. J.; KLUGMAN, K.P.; PORTER, B. D.; SÁ-LEÃO, R.; SCOTT, J. A.; NOHYNEK, H.; O'BRIEN, K. L. & WHO PNEUMOCOCCAL CARRIAGE WORKING GROUP. **Standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*: Updated recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group.** Vaccine 32, 165-179, 2014.

- SHARMAA, S. K.; ROUMANESB, D.; ALMUDEVARC, A.; MOSMANNB, T. R. & PICHICHEROA, M. E. **CD4+ T-cell responses among adults and young children in response to *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* vaccine candidate protein antigens.** Vaccine, 31, 3090–3097, 2013.
- SOUZA, A.R.V. **Caracterização de amostras de *Streptococcus pneumoniae* resistentes à optoquina isoladas de pacientes e portadores assintomáticos.** Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.
- SPELLERBERG, B. & BRANDT, C. ***Streptococcus*** In: Manual of Clinical Microbiology. 331-349, 2011.
- SWIATLO, E.; BROOKS-WALTER, A.; BRILES, D.E. & McDANIEL, L.S. **Oligonucleotides identify conserved and variable regions of *pspA* and *pspA*-like sequences of *Streptococcus pneumoniae*.** Gene. 188, 279 – 284, 1997.
- TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.C.; MERQUIOR, V.L.C.; STEIGERWALT, A.G.; BRENNER, D.J. & FACKLAM, R.R. **Phenotypic and Genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strains isolates from human source.** J. Clin. Microbiol. 35, 2778 - 2781, 1997.
- TOIKKA, P.; NIKKARI, S.; RUUSKANEN, O.; LEINONEN, M. & MERTSOLA, J. **Pneumolysin PCR-based diagnosis of invasive pneumococcal infection in children.** J. Clin. Microbiol. 37, 633-637, 1999.
- TOMIC, V. & DOWZICKY, M.J. **Regional and global antimicrobial susceptibility among isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) from 2009 to 2012 and comparison with previous years of T.E.S.T. (2004-2008).** Ann Clin Microbiol Antimicrob. 13, 52, 2014.
- TSENG, H.J.; McEWAN, A.G.; PATON, J.C. & JENNINGS, M.P. **Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: *psaA* mutants are hypersensitive to oxidative stress.** Infect Immun. 70, 1635-1639, 2002.
- TSOLIA, M.N.; STAMOS, G.; IOANNIDOU, S.; TREFLER, R.; FOUSTOUKOU, M.; KAFETZIS, D. & PORAT, N. **Genetic relatedness of resistant and multiresistant *Streptococcus pneumoniae* strains, recovered in the Athens area, to international clones.** Microb. Drug. Resist. 8, 219-226, 2002.
- TUOMANEN, E. **Molecular and cellular biology of pneumococcal infection.** Curr Opin Microbiol. 2, 35-39, 1999.
- USUF, E.; BOTTOMLEY, C.; ADEGBOLA, R.A. & HALL, A. **Pneumococcal carriage in sub-Saharan Africa--a systematic review.** PLoS One. 9, 2014.
- VALENTINO, M.D.; MCGUIRE, A.M.; ROSCH, J.W.; BISPO, P.J.; BURNHAM, C.; SANFILIPPO, C.M.; CARTER, R.A.; ZEGANS, M.E.; BEALL, B.; EARL, A.M.; TUOMANEN, E.I.; MORRIS, T.W.; HAAS, W. & GILMORE, M.S. **Unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* from conjunctivitis encode variant traits and belong to a distinct phylogenetic cluster.** Nat Commun. 12, 5411, 2014.
- VAN DER LINDEN, M.; WINKEL, N.; KÜNTZEL, S.; FARKAS, A.; PERNICIARO, S.R.; REINERT, R.R. & IMÖHL, M. **Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* serogroup 6 isolates from IPD in children and adults in Germany.** PLoS One, 8, 60848, 2013.
- VAN DE VOOREN, K.; DURANTI, S.; CURTO, A. & GARATTINI, L. **Cost effectiveness of the new pneumococcal vaccines: a systematic review of European studies.** Pharmacoeconomics, 32, 29-45, 2014.
- VERHAGEN, L.M.; LUESINK, M.; WARRIS, A.; DE GROOT, R. & HERMANS, P.W. **Bacterial respiratory pathogens in children with inherited immune and airway disorders: nasopharyngeal carriage and disease risk.** Pediatr Infect Dis J. 32, 399-404, 2013.
- WEISER, J.N. **The pneumococcus: why a commensal misbehaves.** J. Mol. Med. 88, 97-102, 2010.
- WERNO, A. M.; CHRISTNER, M.; ANDERSON, T.P. & MURDOCH, D.R. **Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from nonpneumococcal streptococci of the *Streptococcus mitis* group by**

matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 50, 2863-2867, 2012.

WILLIAMSON, Y.M.; GOWRISANKAR, R.; LONGO, D.L.; FACKLAM, R.; GIPSON, I.K.; ADES, E.P.; CARLONE, G.M. & SAMPSON, J.S. **Adherence of nontypeable *Streptococcus pneumoniae* to human conjunctival epithelial cells.** Microb Pathog. 44,175-185, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological record.** WHO. 87, 129–144, 2012.

WRIGHT, A.K.; BANGERT, M.; GRITZFELD, J.F.; FERREIRA, D.M.; JAMBO, K.C.; WRIGHT, A.D.; COLLINS, A.M. & GORDON, S.B. **Experimental human pneumococcal carriage augments IL-17A-dependent T-cell defence of the lung.** PLoS Pathog. 9, 2013.

XIN, W.; LI, Y.; MO, H.; ROLAND, K.L. & CURTISS, R. **PspA family fusion proteins delivered by attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium extend and enhance protection against *Streptococcus pneumoniae*.** Infect Immun. 77,4518-28, 2009.

YATIM, M.M.; MASRI, S.N.; DESA, M.N.; TAIB, N.M.; NORDIN, S.A. & JAMAL, F. **Determination of phenotypes and pneumococcal surface protein A family types of *Streptococcus pneumoniae* from Malaysian healthy children.** J Microbiol Immunol Infect. XX, 1-7 , 2012.

YOSHIOKA, C.R.; MARTINEZ, M.B.; BRANDILEONE, M.C.; RAGAZZI, S.B.; GUERRA, M.L.; SANTOS, S.R., SHIEH, H.H. & GILIO, A.E. **Analysis of invasive pneumonia-causing strains of *Streptococcus pneumoniae*: serotypes and antimicrobial susceptibility.** J. Pediatr. 87, 70-75, 2011.

ZUCCOTTI, G.; MAMELI, C.; DAPRAI, L.; GARLASCHI, M.L.; DILILLO, D.; BEDOGNI, G.; FACCINI, M.; GRAMEGNA, M.; TORRESANI, E.; PNEUMI STUDY GROUP (PMSG); BALLERINI, E.; BENINCASO, A.; BONVISSUTO, M.; BRICALLI, D.; BRIOSCHI, M.; CALLONI, C.S.; CAMILETTI, M.I.; COLELLA, G.; DE ANGELIS, L.; DECARLIS, S.; DI NELLO, F.; DOZZI, M.; GALLI, E.; GANDINI, V.; GIULIANI, M.G.; LAVIOLA, F.; LODA, B.; MACEDONI, M.; MAZZUCCHI, E.; METTA, M.G.; MOSCATIELLO, A.; NANNINI, P.; PETRUZZI, M.; PICICCO, D.; PICCIOTTI, M.; PISANELLI, S.; PORTA, N.; RAMPONI, G.; REDAELLI, F.; RUBINI, R.; SALA, N.; SAITTA, V.; SCELZA, G.; TISO, R.M.; TOMASETTO, M.; TORCOLETTI, M.; TRAVAINI, M.; VALENTINI, M. & VESSIA, C. **Serotype distribution and antimicrobial susceptibilities of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* from healthy children in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine era.** Vaccine. 32, 527-534, 2014.

ANEXO

Anexo 1-Características das 413 amostras de *Streptococcus pneumoniae* incluídas neste estudo

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 0059	Ribeirão Preto	1988	Sangue	9N	NS	738	2	
Sp 0060	Ribeirão Preto	1988	Sangue	9N	NS	738	2	
Sp 0061	Ribeirão Preto	1988	ND	9N	NS	738	2	
Sp 0107	Ribeirão Preto	1989	Sangue	14	S	15	1	
Sp 0131	Rio de Janeiro	1989	ND	14	S	15	1	
Sp 0139	Ribeirão Preto	1990	Sangue	14	S	15	1	
Sp 0156	Ribeirão Preto	1990	Sangue	9N	S	66	2	
Sp 0168	Rio de Janeiro	1990	Líquido Pleural	14	S	15	1	
Sp 0179	Rio de Janeiro	1990	Sangue	14	S	15	1	
Sp 0180	Rio de Janeiro	1990	Sangue	9V	S	162	2	
Sp 0186	Rio de Janeiro	1990	Sangue	14	NS	15	1	
Sp 0235	Ribeirão Preto	1990	Escarro	9N	S	66	2	
Sp 0254	Rio de Janeiro	1991	Sangue	9N	S	66	2	
Sp 0265	São Paulo	1991	Líquido Peritoneal	14	S	15	1	
Sp 0266	São Paulo	1991	Sangue	9N	NS	738	1	
Sp 0274	São Paulo	1991	Sangue	14	NS	773	1	
Sp 0276	São Paulo	1991	LCR	14	S	15	1	
Sp 0291	São Paulo	1991	Líquido Pleural	14	NS	66	1	
Sp 0293	Rio de Janeiro	1991	ND	14	S	15	1	
Sp 0296	São Paulo	1991	Sangue	14	NS	66	2	
Sp 0306	São Paulo	1991	Sangue	14	S	15	1	
Sp 0308	São Paulo	1991	LCR	14	NS	66	2	

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 0312	São Paulo	1991	Sangue	9V	S	162	2	
Sp 0321	Vitória	1991	ND	14	S	15	1	
Sp 0324	Vitória	1991	ND	14	S	15	1	
Sp 0325	Vitória	1991	ND	14	S	15	1	
Sp 0329	Vitória	1991	ND	14	S	15	1	
Sp 0349	São Paulo	1991	Sangue	14	S	15	2	
Sp 0366	São Paulo	1991	Sangue	14	S	15	1	
Sp 0372	São Paulo	1991	Sangue	6C	S		1	1
Sp 0386	São Paulo	1992	Sangue	9N	S	66	2	
Sp 0387	São Paulo	1992	Secreção Ocular	14	NS	66	2	
Sp 0403	São Paulo	1992	Líquido Pleural	9V	S	162	2	
Sp 0411	São Paulo	1992	ND	6C	S		1	1
Sp 0414	São Paulo	1992	Sangue	9V	S	162	2	
Sp 0416	São Paulo	1992	Sangue	14	NS	66	2	
Sp 0418	São Paulo	1992	Sangue – LCR	9N	S	66	2	
Sp 0436	São Paulo	1992	Sangue	14	NS	66	2	
Sp 0447	São Paulo	1992	Abcesso Nasal/Olho	9V	S	162	2	3
Sp 0450	São Paulo	1992	Sangue	14	S	15	1	1
Sp 0465	São Paulo	1992	Sangue	14	S	15	1	
Sp 0466	São Paulo	1992	Sangue	14	S	15	1	
Sp 0475	São Paulo	1992	Orofaringe	9V	S	162	2	
Sp 0484	São Paulo	1992	Sangue	9A	S	162	2	
Sp 0486	São Paulo	1992	Secreção Traqueal	9V	S	162	2	
Sp 0488	São Paulo	1992	Sangue	9L	S	8001	2	
Sp 0513	São Paulo	1992	Escarro	14	NS	66	2	

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 0514	São Paulo	1992	Orofaringe	14	NS	66	2	
Sp 0515	São Paulo	1992	Sangue	14	NS	66	2	
Sp 0526	Niterói	1993	BAL	14	S	7038	2	
Sp 0527	Niterói	1993	Secreção Peritoneal	14	S	15	1	
Sp 0532	Rio de Janeiro	1994	Sangue	14	S	7039	1	
Sp 0539	Rio de Janeiro	1994	LCR	14	S	15	1	
Sp 0550	Rio de Janeiro	1994	LCR	14	S	15	1	
Sp 0559	Rio de Janeiro	1994	LCR	9V	S	280	1	
Sp 0561	Rio de Janeiro	1994	LCR	9N	S	66	2	
Sp 0566	Rio de Janeiro	1994	LCR	9N	S	66	2	
Sp 0568	São Paulo	1994	Líquido Pleural	14	S	723	2	
Sp 0571	São Paulo	1994	Sangue	6A	S		1	1
Sp 0587	Rio de Janeiro	1994	LCR	14	S	7040	1	
Sp 0590	Rio de Janeiro	1994	Sangue	14	S	7041	1	
Sp 0601	Rio de Janeiro	1994	LCR	14	S	7042	2	
Sp 0603a	Rio de Janeiro	1994	LCR	14	S	7042	2	
Sp 0607	Rio de Janeiro	1994	LCR	14	S	124	2	
Sp 0621	Rio de Janeiro	1994	LCR	14	S	13	1	
Sp 0624	Rio de Janeiro	1994	LCR	9V	S	162	2	
Sp 0630	Rio de Janeiro	1994	LCR	14	NS	13	1	
Sp 0631	Rio de Janeiro	1994	LCR	14	S	7114	1	
Sp 0643	Rio de Janeiro	1994	LCR	14	S	15	1	
Sp 0648	Rio de Janeiro	1994	LCR	9N	S	66	2	
Sp 0654	Rio de Janeiro	1994	LCR	6A	S		2	5
Sp 0658	Rio de Janeiro	1994	LCR	6A	S		1	2

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 0661	Rio de Janeiro	1994	LCR	14	S	15	1	
Sp 0664	Niterói	1994	LCR	14	S	773	1	
Sp 0665	Niterói	1994	LCR	14	S	15	1	
Sp 0667	Rio de Janeiro	1994	LCR	14	S	15	1	
Sp 0671	São Paulo	1994	Sangue	9V	S	162	2	
Sp 0685	São Paulo	1994	Líquido Peritoneal	14	NS	66	2	
Sp 0698	Rio de Janeiro	1994	LCR	14	S	15	1	
Sp 0702	São Paulo	1994	Sangue	14	NS	66	2	
Sp 0744	Rio de Janeiro	1995	LCR	9V	S	280	1	1
Sp 0745	Rio de Janeiro	1995	LCR	9A	S	280	1	
Sp 0749	Rio de Janeiro	1995	Secreção Brônquica	14	S	15	1	
Sp 0756	Rio de Janeiro	1995	LCR	14	NS	199	2	
Sp 0770	São Paulo	1995	ND	14	S	15	1	
Sp 0775	São Paulo	1995	ND	14	NS	156	2	
Sp 0782	Rio de Janeiro	1995	LCR	14	S	15	1	
Sp 0784	Rio de Janeiro	1995	LCR	9N	S	66	2	
Sp 0798	Rio de Janeiro	1995	Aspirado Medular	14	S	15	1	
Sp 0803	Rio de Janeiro	1995	Sangue	9N	S	66	2	3
Sp 0807	Rio de Janeiro	1995	Sangue	14	S	7039	1	
Sp 0829	Rio de Janeiro	1995	Escarro	9N	S	66	2	
Sp 0850	Porto Alegre	1996	LCR	14	NS	5401	1	1
Sp 0858	Porto Alegre	1996	Escarro	9V	NS	156	2	
Sp 0865	Santa Catarina	1996	LCR	14	NS	66	2	
Sp 0866	Santa Catarina	1996	Secreção Auricular	14	NS	156	2	
Sp 0867	Porto Alegre	1996	Sangue	9V	S	280	1	

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 0873	Rio de Janeiro	1996	Sangue	9V	S	162	2	
Sp 0876	ND	1996	BAL	9V	S	162	2	
Sp 0880	ND	1996	BAL	9V	S	162	2	
Sp 0885	Ribeirão Preto	1996	Sangue	14	S	66	2	
Sp 0886	Ribeirão Preto	1996	LCR	14	S	15	1	
Sp 0896	Ribeirão Preto	1996	Sangue	9N	NS	66	2	
Sp 0897	Ribeirão Preto	1996	Sangue	14	S	15	1	
Sp 0899	Ribeirão Preto	1996	Líquido Pleural	14	NS	66	2	
Sp 0903	Ribeirão Preto	1996	Sangue	14	S	423	1	
Sp 0904	Ribeirão Preto	1996	Sangue	9V	S	162	2	3
Sp 0910	Porto Alegre	1997	Escarro	6A	S		1	1
Sp 0911	Porto Alegre	1997	Escarro	9V	NS	156	2	3
Sp 0913	Porto Alegre	1997	Abcesso	23F	S		2	3
Sp 0917	Porto Alegre	1997	Sangue	6B	NS	748	1	2
Sp 0921	Porto Alegre	1997	Sangue	18C	S	193	2	4
Sp 0933	Porto Alegre	1997	Escarro	14	NS	156	2	
Sp 0947	Porto Alegre	1997	LCR	14	S	5403	1	
Sp 0948	Porto Alegre	1997	Escarro	14	S	5401	1	
Sp 0979	Porto Alegre	1997	Secreção Traqueal	14	NS	156	2	3
Sp 0985	Porto Alegre	1997	LCR	14	NS	7138	2	3
Sp 0987	Porto Alegre	1997	Sangue	16F	S	4891	2	3
Sp 0995	Porto Alegre	1997	Escarro	14	NS	156	2	
Sp 0996b	Porto Alegre	1997	Escarro	14	NS		2	
Sp 0997	Porto Alegre	1997	Sangue	14	NS	5404	1	
Sp 1001	Porto Alegre	1997	Sangue	14	NS	156	2	3

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 1003	Porto Alegre	1997	Sangue	14	S	124	1	
Sp 1008	Porto Alegre	1997	Secreção Ocular	10A	S	741	1	1
Sp 1010	Porto Alegre	1997	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1011	Porto Alegre	1997	Escarro	6C	S		1	1
Sp 1015	Porto Alegre	1997	Escarro	6C	S		1	1
Sp 1019	Porto Alegre	1997	Escarro	9N	S	737	2	
Sp 1022	Porto Alegre	1997	Líquido Pleural	14	NS	156	2	
Sp 1025	Porto Alegre	1997	LCR	14	NS	156	2	
Sp 1032	Rio de Janeiro	1997	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1033	Rio de Janeiro	1997	Líquido Pericárdico	14	NS	156	2	3
Sp 1040	Porto Alegre	1997	Escarro	14	NS	156	2	3
Sp 1043	Paraíba	1997	ND	14	S	15	1	
Sp 1044	Paraíba	1997	ND	14	S	15	1	
Sp 1045	Paraíba	1997	ND	14	S	15	1	
Sp 1046	Paraíba	1997	LCR	14	S	15	1	
Sp 1047	Paraíba	1997	LCR	14	S	15	1	
Sp 1060	Porto Alegre	1998	Sangue	9V	S	7998	2	
Sp 1067	Porto Alegre	1998	Sangue	14	NS	5401	1	
Sp 1068	Porto Alegre	1998	BAL	14	NS	5401	1	
Sp 1087	Porto Alegre	1998	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1092	Porto Alegre	1998	Sangue	14	S	5401	1	1
Sp 1101	Porto Alegre	1998	Secreção Auricular	14	NS	156	2	
Sp 1102	Porto Alegre	1998	Sangue	14	S	796	1	
Sp 1115	Porto Alegre	1998	LCR	9V	S	162	1	1
Sp 1128	Porto Alegre	1998	Sangue	9V	S	162	2	

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 1141	Rio de Janeiro	1998	Secreção Brônquica	14	S	15	1	
Sp 1156	Rio de Janeiro	1998	BAL	9N	S	7999	2	
Sp 1170	Rio de Janeiro	1998	ND	14	S	15	1	
Sp 1179	São Paulo	1999	Orofaringe	14	NS	66	2	
Sp 1184	São Paulo	1999	Orofaringe	9V	S	162	2	
Sp 1197	São Paulo	1999	Orofaringe	14	NS	66	2	3
Sp 1230	São Paulo	1999	Orofaringe	9V	S	162	2	
Sp 1231	São Paulo	1999	Orofaringe	9V	S	162	2	
Sp 1243	São Paulo	1999	Orofaringe	9V	S	162	2	
Sp 1264	Porto Alegre	1999	Sangue	14	NS	66	2	
Sp 1265	Porto Alegre	1999	Sangue	14	NS	66	2	
Sp 1271	Porto Alegre	1999	Líquido Pleural	14	NS	156	2	
Sp 1292	Porto Alegre	1999	Escarro	14	S	5401	1	1
Sp 1293	Porto Alegre	1999	Sangue	14	S	5401	2	
Sp 1302	Porto Alegre	1999	Líquido Pleural	14	S	5401	1	1
Sp 1307	Porto Alegre	1999	Sangue	14	S	7043	2	
Sp 1308	Porto Alegre	1999	Secreção Traqueal	14	S	7043	2	
Sp 1309	Porto Alegre	1999	Sangue	9V	S	162	2	
Sp 1316	Porto Alegre	1999	Sangue	14	NS	156	2	3
Sp 1322	São Paulo	1999	Líquido Peritoneal	9V	S	162	2	
Sp 1329	São Paulo	1999	Orofaringe	14	S	15	1	
Sp 1334	São Paulo	1999	Orofaringe	14	NS	66	2	
Sp 1340	São Paulo	1999	Orofaringe	14	S	199	2	
Sp 1341	São Paulo	1999	Orofaringe	14	S	199	2	
Sp 1351	São Paulo	1999	Orofaringe	9V	S	162	2	

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 1353	São Paulo	1999	Orofaringe	9A	S	4024	2	3
Sp 1368	Rio de Janeiro	1999	Sangue	14	S	15	1	
Sp 1408	Rio de Janeiro	1999	ND	14	S	15	1	
Sp 1413	Rio de Janeiro	1999	Secreção Ocular	14	S	7139	1	
Sp 1414	Rio de Janeiro	1999	Escarro	9N	NS	66	2	
Sp 1418	São Paulo	1999	Orofaringe	14	S	7044	1	
Sp 1428	São Paulo	1999	Orofaringe	9V	S	162	2	3
Sp 1451	São Paulo	1999	Líquido Pleural	9V	S	162	2	
Sp 1465	Rio de Janeiro	1999	Secreção Ocular	14	NS	7113	2	
Sp 1484	Rio de Janeiro	1999	Nasofaringe	14	NS	156	2	3
Sp 1511	São Paulo	2000	Orofaringe	5	R		1	
Sp 1514	Rio de Janeiro	2000	Sangue	14	S	15	1	
Sp 1516	Rio de Janeiro	2000	Nasofaringe	14	NS	7045	2	
Sp 1534	Rio de Janeiro	2000	Orofaringe	14	S	15	1	
Sp 1551	São Paulo	2001	ND	14	NS	156	2	
Sp 1562	Porto Alegre	2001	ND	14	S	5401	2	
Sp 1564	Porto Alegre	2001	ND	14	S	4911	2	
Sp 1570	Porto Alegre	2001	ND	14	S	5401	2	
Sp 1575	Porto Alegre	2001	ND	14	NS	7046	1	
Sp 1591	Porto Alegre	2001	ND	14	S	5401	2	
Sp 1596	Porto Alegre	2001	ND	9V	NS	156	2	
Sp 1598	Porto Alegre	2001	ND	14	NS	156	2	
Sp 1608	Porto Alegre	2001	ND	14	NS	156	2	
Sp 1609	Porto Alegre	2001	ND	14	NS	156	2	3
Sp 1626	Porto Alegre	2001	ND	9N	S	737	2	

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 1640	Porto Alegre	2001	Líquido Pleural	14	NS	156	2	
Sp 1644	Porto Alegre	2001	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1654	Porto Alegre	2001	LCR	14	NS	156	2	3
Sp 1655A	Porto Alegre	2001	Líquido Pleural	9V	S	5645	2	3
Sp 1661	Porto Alegre	2001	Sangue	1	S	304	1	1
Sp 1663	Porto Alegre	2001	Escarro	9V	NS	156	2	
Sp 1664	Porto Alegre	2001	Secreção Traqueal	9V	NS	156	2	
Sp 1665	Porto Alegre	2001	Secreção Traqueal	9V	NS	156	2	
Sp 1668	Porto Alegre	2001	Sangue	9V	S	162	2	
Sp 1674	Porto Alegre	2001	Escarro	14	NS	156	2	
Sp 1680	Porto Alegre	2001	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1683	Porto Alegre	2001	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1689	Porto Alegre	2001	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1690	Porto Alegre	2001	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1692	Porto Alegre	2001	Escarro	9V	NS	156	2	
Sp 1693	Porto Alegre	2001	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1694	Porto Alegre	2001	Sangue	14	S	5401	2	
Sp 1706	Porto Alegre	2001	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1708	Porto Alegre	2001	Escarro	14	NS	156	2	
Sp 1711	Porto Alegre	2001	LCR	14*	NS	387	1	
Sp 1712	Porto Alegre	2001	Líquido Pleural	9V	S	162	2	
Sp 1721	Porto Alegre	2001	Líquido Pleural	14	S	15	1	
Sp 1723	Porto Alegre	2001	LCR	9V	S	162	2	
Sp 1724	Porto Alegre	2001	ND	14	NS	156	2	
Sp 1725	Porto Alegre	2001	ND	9N	S	66	2	

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 1726A	Porto Alegre	2001	Sangue	9N	S	5006	1	
Sp 1729	Porto Alegre	2001	Líquido Pleural	14	S	5583	2	
Sp 1732	Porto Alegre	2001	LCR	14	NS	156	2	
Sp 1734	Porto Alegre	2001	LCR	14	S	5401	2	
Sp 1735	Porto Alegre	2001	Sangue	9N	NS	66	2	
Sp 1742	Porto Alegre	2001	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1744	Porto Alegre	2001	LCR	14	NS	156	2	
Sp 1747	Porto Alegre	2001	LCR	9V	S	162	2	
Sp 1751	Porto Alegre	2001	LCR	14	NS	156	2	
Sp 1767	Rio de Janeiro	2000	ND	9N	S	66	2	
Sp 1768	Rio de Janeiro	2000	ND	9N	S	66	2	
Sp 1772	Rio de Janeiro	2000	ND	14	NS	156	2	
Sp 1777	Rio de Janeiro	2000	ND	23F	NS	338	1	
Sp 1813	Rio de Janeiro	2000	ND	11A	S	7036	2	3
Sp 1835	Rio de Janeiro	2000	ND	10A	S	741	1	1
Sp 1849	Rio de Janeiro	2001	ND	6B	NS	7037	1	1
Sp 1879	Rio de Janeiro	2002	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1883	Ribeirão Preto	2003	ND	9V	S	162	2	
Sp 1888	Ribeirão Preto	2003	Nasofaringe	14	NS	156	2	
Sp 1890	Ribeirão Preto	2003	Nasofaringe	14	NS	66	2	
Sp 1900	Ribeirão Preto	2003	Nasofaringe	14	NS	66	2	
Sp 1913	Ribeirão Preto	2003	Nasofaringe	14	NS	66	2	
Sp 1916	Ribeirão Preto	2003	Portador	9V	NS	162	2	3
Sp 1917	Ribeirão Preto	2003	Nasofaringe	14	NS	66	2	
Sp 1922	Ribeirão Preto	2003	Nasofaringe	14	NS	156	2	

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 1930	Rio de Janeiro	2003	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1957	Rio de Janeiro	2003	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1973	Ribeirão Preto	2003	Portador	14	NS	156	2	
Sp 1980	Rio de Janeiro	2003	Sangue	14	S	738	2	
Sp 1981	Porto Alegre	2003	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1984A	Porto Alegre	2003	Sangue	9V	S	162	2	
Sp 1986	Porto Alegre	2003	Sangue	9V	NS	156	2	
Sp 1988	Porto Alegre	2003	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1990	Porto Alegre	2003	Sangue	14	S	7140	1	
Sp 1992	Porto Alegre	2003	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1993	Porto Alegre	2003	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 1997	Porto Alegre	2003	Sangue	9V	NS	156	2	
Sp 2006	Porto Alegre	2003	Sangue	9V	NS	156	2	
Sp 2008	Porto Alegre	2003	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 2009	Porto Alegre	2003	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 2011	Porto Alegre	2003	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 2013	Porto Alegre	2003	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 2014	Porto Alegre	2003	Líquido Pleural	14	NS	156	2	
Sp 2015	Porto Alegre	2003	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 2018	Porto Alegre	2003	Sangue	9N	S	8000	2	
Sp 2019	Porto Alegre	2003	Sangue	14	NS	4860	1	
Sp 2020	Porto Alegre	2003	Sangue	9V	NS	156	2	
Sp 2026	Porto Alegre	2003	LCR	9N	S	66	2	
Sp 2027	Porto Alegre	2003	Sangue	9N	S	66	2	
Sp 2030	Porto Alegre	2003	Líquido Pleural	14	S	4859	1	

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 2037	Porto Alegre	2003	Sangue	8	S	53	1	
Sp 2046	Porto Alegre	2003	Sangue	14	NS	4964	2	
Sp 2047	Porto Alegre	2003	ND	14	S	7088	2	
Sp 2058	Porto Alegre	2003	ND	14	NS	156	1	
Sp 2064	Porto Alegre	2003	ND	9V	NS	156	2	
Sp 2065	Porto Alegre	2003	ND	14	NS	4973	2	
Sp 2067	Porto Alegre	2003	ND	14	NS	156	2	
Sp 2084	Porto Alegre	2004	Escarro	9V	NS	156	2	
Sp 2088	Porto Alegre	2004	Sangue	9V	NS	162	2	
Sp 2090	Porto Alegre	2004	Sangue	28A	S	494	1	
Sp 2091	Porto Alegre	2004	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 2092	Porto Alegre	2004	Sangue	14	S	7047	2	
Sp 2093	Porto Alegre	2004	LCR	9V	S	162	2	
Sp 2094	Porto Alegre	2004	LCR	14	NS	156	2	
Sp 2103	Porto Alegre	2004	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 2105	Porto Alegre	2004	Escarro	9N	S	66	2	
Sp 2107	Porto Alegre	2004	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 2108	Porto Alegre	2004	Sangue	14	NS	4969	2	
Sp 2110	Porto Alegre	2004	Sangue	14	NS	4971	2	
Sp 2111	Porto Alegre	2004	Sangue	9V	NS	156	2	
Sp 2112	Porto Alegre	2004	Escarro	14	NS	66	2	
Sp 2115	Porto Alegre	2004	Escarro	9N	S	66	2	
Sp 2118	Porto Alegre	2004	Escarro	14	NS	156	2	
Sp 2123	Porto Alegre	2004	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 2124	Porto Alegre	2004	Sangue	14	NS	156	2	

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 2131	Porto Alegre	2004	ND	14	NS	156	2	
Sp 2134	Porto Alegre	2004	Líquido Pleural	14	NS	156	1	
Sp 2136	Porto Alegre	2004	LCR	14	NS	156	1	
Sp 2150	Porto Alegre	2004	Sangue	14	NS	144	2	
Sp 2152	Porto Alegre	2004	ND	14	NS	156	2	3
Sp 2158	Porto Alegre	2004	Escarro	14	S	5401	1	
Sp 2159	Rio de Janeiro	2004	Sangue	14	NS	156	2	
Sp 2161	Rio de Janeiro	2004	LCR	9V	S	162	2	
Sp 2166	Rio de Janeiro	2005	Sangue	14	NS	66	2	
Sp 2167	Rio de Janeiro	2005	Líquido Pleural	14	NS	738	2	
Sp 2168	Rio de Janeiro	2005	Líquido Pleural	14	NS	156	2	
Sp 2175	Rio de Janeiro	2006	Sangue	13	S	761	1	
Sp 2196	Rio de Janeiro	2007	Sangue	14	NS	7095	2	3
Sp 2204	Rio de Janeiro	2007	Sangue	9N	S	738	1	
Sp 2205	Rio de Janeiro	2007	Sangue	9N	S	7085	2	3
Sp 2206	Rio de Janeiro	2007	Sangue	9N	S	738	2	
Sp 2213	Rio de Janeiro	2008	Sangue	14	NS	156	1	
Sp 2216	Rio de Janeiro	2008	LCR	9N	S	66	2	
Sp 2222	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	6C	S	3930	1	
Sp 2223	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	6B	S	7075	1	1
Sp 2224	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	19A	S	733	2	
Sp 2225	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	6B	S	7075	1	
Sp 2226	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	6C	S	3930	1	
Sp 2227	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	23B	NS	387	1	
Sp 2228	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	15B	S	6349	1	

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 2229	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	6B	NS	7076	1	
Sp 2230	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	15C	S	6349	1	
Sp 2231	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	6C	S	3930	1	
Sp 2232	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	6C	S	3930	1	
Sp 2233	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	14	NS	6350	2	
Sp 2234	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	15C	NS	338	1	
Sp 2235b	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	19A	S	733	1	
Sp 2236	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	15C	S	338	1	
Sp 2237b	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	6C	S	3930	1	
Sp 2238	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	24F	NS	338	1	
Sp 2239	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	6C	S	3930	1	
Sp 2240	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	6C	S	3930	1	
Sp 2241a	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	34	S	743	1	1
Sp 2241b	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	6	S		1	
Sp 2242	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	6C	S	3930	1	1
Sp 2243	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	15C	S	6349	1	
Sp 2244	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	6C	S	3930	1	
Sp 2245	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	11A	S	280	1	1
Sp 2246a	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	19A	S	733	2	
Sp 2246b	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	6C	S	3930	1	
Sp 2247	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	14	NS	6350	2	3
Sp 2248	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	6C	S	3930	1	
Sp 2249	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	23B	NS	387	1	
Sp 2250	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	19A	S	733	2	
Sp 2251	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	15C	S	6349	1	

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 2252	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	15C	S	6349	1	1
Sp 2253	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	23F	NS	387	1	
Sp 2255	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	19A	S	733	2	
Sp 2256	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	6C	S	3930	1	
Sp 2257	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	19A	S	733	2	
Sp 2258	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	3	S	180	2	
Sp 2259b	Angra dos Reis	2009	Nasofaringe	6	S		1	
Sp 2260	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	19A	S	733	2	
Sp 2262	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	37	S	6573	1	
Sp 2263	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	19A	S	733	2	3
Sp 2264	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	3	S	180	2	3
Sp 2265	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	15C	S	338	1	2
Sp 2266	Angra dos Reis	2008	Nasofaringe	17F	S	739	2	
Sp 2271	Rio de Janeiro	2009	Sangue	9V	NS	156	2	3
Sp 2272	Rio de Janeiro	2009	Sangue	9V	NS	156	2	
Sp 2273	Rio de Janeiro	2009	LCR	18C	NS		2	4
Sp 2274	Angra dos Reis	2009	Nasofaringe	19A	NS	6349	1	
Sp 2275	Angra dos Reis	2009	Nasofaringe	19A	NS	2878	2	3
Sp 2277	Rio de Janeiro	2009	Líquido Pleural	14	NS	156	2	
Sp 2279	Rio de Janeiro	2010	LCR	12F	S	218	1	
Sp 2282	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	15B	S	766	1	1
Sp 2283	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	15B	S	766	1	
Sp 2284	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	14	NS	156	2	
Sp 2285	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	21	S	731	2	
Sp 2286	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	14*	S	7022	3	6

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 2287	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	6B	S	724	2	3
Sp 2289	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	NT*	S	448	2	3
Sp 2292	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	18B	S	193	2	
Sp 2293	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	16F	NS	7027	2	
Sp 2296	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	6B	S	724	2	
Sp 2297	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	14	NS	156	2	3
Sp 2298	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	23F	NS	338	2	
Sp 2299	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	23F	NS	338	2	
Sp 2300	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	23F	S	338	2	
Sp 2301	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	23F	S	338	2	
Sp 2302	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	18A	NS	7028	2	
Sp 2303	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	6B	S	724	1	
Sp 2304	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	15B	S	766	1	
Sp 2305	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	14	NS	156	2	
Sp 2306	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	19F	NS	177	2	
Sp 2307	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	NT*	NS	7029	3	6
Sp 2308	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	23F	NS	338	2	
Sp 2309	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	15C	S	766	1	
Sp 2310	Campos dos Goytacazes	2011	Nasofaringe	23F	NS	338	2	
Sp 2313	Campos dos Goytacazes	2011	Secreção Traqueal	8	S		1	
Sp 2314	Campos dos Goytacazes	2011	LCR	1	S		2	
Sp 2316	Campos dos Goytacazes	2012	LCR	19A	S		2	
Sp 2344	Campos dos Goytacazes	2012	LCR	16F	S		2	
Sp 2345	Porto Alegre	2012	Escarro	14	S		2	3
Sp 2349	Campos dos Goytacazes	2013	LCR	38	S		1	

Amostra	Local	Ano	Origem clínica^a	Tipo^b	PEN^c	ST	Família PspA	Clade PspA
Sp 2350	Campos dos Goytacazes	2013	LCR	18C	S		2	
Sp 2352	Campos dos Goytacazes	2014	Liquor	20	S		2	
NHG140A	Niterói	2010	Nasofaringe	NT*	NS	2315	2	3
NHG78	Niterói	2010	Nasofaringe	6A	S	5847	1	2
NCC15	Niterói	2010	Nasofaringe	6B	S	724	1	
NCC14	Niterói	2010	Nasofaringe	6C*	S	7035	2	4
NCC63	Niterói	2010	Nasofaringe	6C*	S	7035	1	1
NHG73	Niterói	2010	Nasofaringe	6C*	S	3930	1	1
NCC27	Niterói	2010	Nasofaringe	6C	S	7035	1	1
NCU10	Niterói	2009	Nasofaringe	14*	S	7022	3	6
NHG22	Niterói	2010	Nasofaringe	14*	S	7022	3	6
NCC87	Niterói	2010	Nasofaringe	6A	S	747	2	5
NHG84	Niterói	2010	Nasofaringe	14*	S		3	6
NCC16B	Niterói	2010	Nasofaringe	NT*	NS	156	2	3
NHG129	Niterói	2010	Nasofaringe	19F	S	763	1	1
NHG134	Niterói	2010	Nasofaringe	23A	S	42	2	4

^aND, não determinado; LCR, líquido cefalorraquidiano; BAL, lavado broncoalveolar

^b14* e 6C*, sorotipo determinado apenas pelo método de PCR multiplex; NT*, resultado negativo com todos os antissoros pela reação de Quellung

^cPEN, susceptibilidade a penicilina; NS, não sensível; S, sensível